

C07C 233/81 (2013.01) **C07D 207/16** (2013.01)
C07D 207/50 (2013.01) **C07D 233/02** (2013.01)
A61K 31/4015 (2013.01) **A61K 31/4166**
(2013.01)
A61P 9/00 (2013.01)

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2006.12.21	(73) Titular(es): ZEALAND PHARMA A/S	
(30) Prioridade(s): 2005.12.23 US 753628 P	SMEDELAND 36 2600 GLOSTRUP	DK
(43) Data de publicação do pedido: 2008.09.10	(72) Inventor(es):	
(45) Data e BPI da concessão: 2013.12.11 021/2014	BJARNE DUE LARSEN	DK
	JORGEN SOBERG PETERSEN	DK
	KETIL JORGEN HAUGAN	DK
	JOHN A. BUTERA	US
	JAMES K. HENNAN	US
	(74) Mandatário:	
	JOSÉ RAUL DE MAGALHÃES SIMÕES	
	RUA CASTILHO, 167 - 2.º 1070-050 LISBOA	PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS MIMÉTICOS DE LISINA MODIFICADOS**

(57) Resumo:

REVELAM-SE COMPOSTOS MIMÉTICOS DE LISINA QUE TÊM ATIVIDADE FARMACOLÓGICA ÚTIL, TAL COMO ATIVIDADE ANTIARRÍTMICA E PROPRIEDADES DE BIODISPONIBILIDADE DESEJÁVEIS.

RESUMO

COMPOSTOS MIMÉTICOS DE LISINA MODIFICADOS

Revelam-se compostos miméticos de lisina que têm atividade farmacológica útil, tal como atividade antiarrítmica e propriedades de biodisponibilidade desejáveis.

DESCRIÇÃO

COMPOSTOS MIMÉTICOS DE LISINA MODIFICADOS

Campo

Os presentes ensinamentos referem-se a compostos miméticos de lisina que têm atividade farmacológica, tal como atividade antiarrítmica, e propriedades desejáveis de biodisponibilidade. Os presentes ensinamentos ainda se referem às composições farmacêuticas que compreendem tais compostos e métodos de utilização e preparação de tais compostos e composições.

Antecedentes

Há um reconhecimento elevado de que a comunicação intercelular é essencial para a homeostase, proliferação e diferenciação celulares. Acredita-se que tal comunicação seja facilitada por junções comunicantes. Estas estruturas são consideradas uma via para acoplar células e permitir a "comunicação cruzada". (Veja-se em geral. Sperelakis N., eds., Cell Interactions and Gap Junctions, CRC Press, Inc. (1989)). A comunicação cruzada entre junções comunicantes é denominada "comunicação intercelular de junção comunicante" (GJIC).

Em geral, as junções comunicantes são regiões especializadas da membrana da célula que contêm conjuntos de centenas a milhares de canais densamente reunidas que conectam diretamente o citoplasma de duas células adjacentes. Os canais de junção comunicante são compostos de dois hemicanais, ou de conexons, proporcionados por cada uma das duas células vizinhas. Cada conexon é, por sua vez, composto de seis proteínas chamadas conexinas.

No coração, a condução de impulsos elétricos ocorre através das junções comunicantes. GJIC anormais estão ligadas a uma variedade de estados de doença, incluindo doença cardíaca. Por exemplo, mostrou-se que ratinhos heterozigóticos para o gene Cx43, que codifica uma conexina ventricular específica, desenvolvem arritmias ventriculares espontâneas e sofrem de morte cardíaca repentina. (Guerrero et al., J. Clin. Invest., 99, 1991-1998 (1997)). Expressão reduzida de Cx43 em ratinhos heterozigóticos está diretamente ligada a uma incidência aumentada de arritmias ventriculares durante isquemia. (Lerner et al., Circulation, 101, 547-552 (2000)). Diversos outros estudos mostraram a expressão reduzida ou a distribuição alterada de Cx43 em corações cronicamente isquêmicos, hibernantes ou hipertrofiados. (Kaprelian et al., Circulation, 97, 651-660 (1998); Peters et al., Circulation, 88, 864-875 (1993); Saffitz et al., Cardiovasc. Res., 42, 309-317 (1999)).

Diversos péptidos que influenciam GJIC foram identificados, incluindo os péptidos antiarrítmicos AAP (Aonuma et al., Chem. Pharm. Bull. (Tokyo), 28, 3332-3339 (1980)), AAP10 (Dhein et al., Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol., 350, 174-184 (1994); Muller et al., Eur. J. Pharmacol., 327, 65-72 (1997)), e HP5 (divulgado na Patente US N° 4.775.743). Entretanto, estes péptidos exibem as características indesejáveis, incluindo a baixa estabilidade, a semivida curta, e uma falta da disponibilidade biológica oral.

O documento WO 2004/048400 descreve dipéptidos que facilitam a comunicação intracelular mediada por junções comunicantes. Este documento propôs que os dipéptidos descritos são úteis no tratamento de doenças associadas com comunicação intracelular de junção comunicante prejudicada.

Sumário

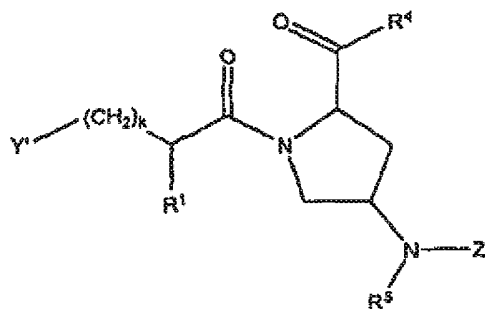
De maneira ampla, os presentes ensinamentos referem-se aos compostos miméticos de lisina, como foi definido na reivindicação 1, que têm a atividade farmacológica útil, tal como atividade antiarrítmica, e propriedades desejáveis de disponibilidade biológica.

Breve Descrição das Figuras

A Figura 1 mostra os resultados de um teste para estudar o efeito dos compostos no esforço metabólico na condução atrial induzida que retarda e num modelo *in vitro* como foi descrito em Haugan et al., J. Cardiovasc. Electrophysiol., 16, 537-545 (2005).

Descrição Pormenorizada

Os presentes ensinamentos proporcionam compostos que tem a Fórmula III:



III

e sais farmacologicamente aceitáveis e hidratos do mesmo, em que:

Y' é NR^2R^3 ;

k é 0;

Z' é benzoilo opcionalmente substituído com 1-5 grupos Q;

Q, em cada ocorrência, independentemente é selecionado a partir de F, Cl, Br, I, C₁₋₁₀ alquilo, CF₃, OCF₃, NO₂, O-C₁₋₁₀ alquilo, OH, NH₂, NH(C₁₋₁₀ alquilo), N(C₁₋₁₀ alquilo)₂, e NHC(O)C₁₋₁₀ alquilo;

R¹ é H;

R² é H e R³ é selecionado a partir de H, C₁₋₁₀alquilo, C(O)R⁶, e C(O)OR⁶;

R⁴ é OH ou NH₂;

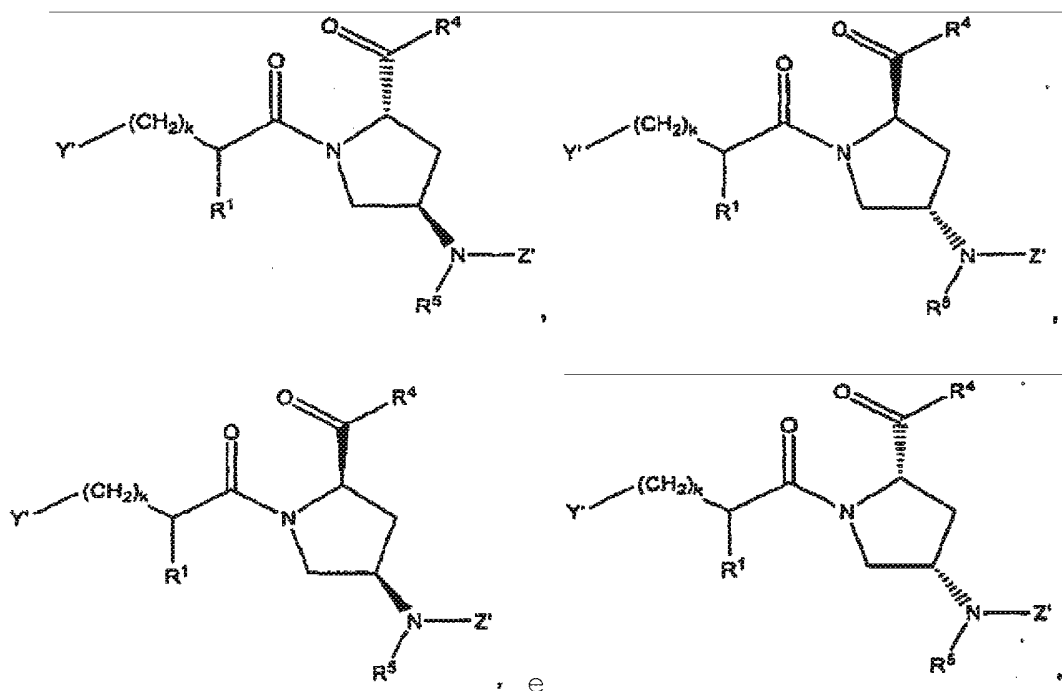
R⁵ é H ou C₁₋₁₀ alquilo;

R⁶ é selecionado a partir de H, e C₁₋₁₀ alquilo.

Em algumas formas de realização, Y' é NR²R³, R² é H, R³ é C(O)R⁶ e R⁶ é H (isto é, R³ é C(O)H) ou um C₁₋₁₀alquilo opcionalmente substituído (por exemplo, R³ é C(O)CH₃).

Z' é benzoilo substituído com 1-5 grupos Q, independentemente selecionado a partir de F, Cl, Br, I, C₁₋₁₀ alquilo, CF₃, OCF₃, NO₂, O-C₁₋₁₀ alquilo, OH, NH₂, NH(C₁₋₁₀ alquilo), N(C₁₋₁₀ alquilo)₂, e NHC(O)C₁₋₁₀ alquilo.

Os compostos de acordo com os presentes ensinamentos incluem aqueles que têm as seguintes estruturas:



e sais farmaceuticamente aceitáveis e hidratos do mesmo.

Em outro aspeto, os presentes ensinamentos proporcionam composições farmacêuticas que compreendem um composto de acordo com os presentes ensinamentos e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Revelam-se no presente documento métodos de prevenção ou tratamento de uma condição patológica que compreende administrar a um indivíduo com necessidade do mesmo (por exemplo, um ser humano) de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto ou composição farmacêutica de acordo com os presentes ensinamentos. Os exemplos das condições patológicas que podem ser tratadas ou prevenidas usando compostos dos presentes ensinamentos incluem, mas não são limitados a, doença cardiovascular (por exemplo, fibrilação atrial, vibração atrial, taquicardia ventricular ou fibrilação ventricular); osteoporose; inflamação do epitélio da via aérea; desordens do tecido alveolar;

incontinência da bexiga; audição danificada, tal como devido às doenças da cóclea; lesões endoteliais; diabetes incluindo neuropatia diabética e retinopatia; condições relacionadas ao CNS; isquemia (por exemplo, isquemia do sistema nervoso central, da medula espinhal, do cérebro ou da haste do cérebro); desordens do tecido dental que incluem a doença periodontal; doenças de rim; manifestações hematológicas (por exemplo, anemia, leucopenia, trombocitopenia, e pancitopenia) especialmente seguindo tratamento com compostos citostáticos ou terapia da irradiação; feridas tais como feridas superficiais e feridas profundas resultando do traumatismo; deficiência erétil; incontinência da bexiga urinária; dor neuropática; inflamação subcrônica e crônica; câncer; falha da transplantação da medula e da célula de haste; condições que se levantam durante a transplantação das células e dos tecidos ou durante procedimentos médicos tais como a cirurgia; condições causadas por um excesso de espécies de oxigênio reativo, de radicais livres ou de óxido nítrico; doenças ou desordens da gravidez (por exemplo, pré-eclampsia e trabalho prematuro); e acidente vascular cerebral.

Os compostos e composições farmacêuticas de acordo com os presentes ensinamentos podem ser formulados para a administração parentérica ou oral.

A. Definições

A menos que especificado de outra maneira, as seguintes definições são proporcionadas para os termos específicos que são usados na seguinte descrição escrita.

Durante toda a descrição e as reivindicações o código de três letras para aminoácidos naturais é usado assim como

em geral aceite três códigos da letra para outros α -aminoácidos, tais como sarcosina (Sar). Onde a forma de L ou de D não foi especificada, deve ser compreendido que o aminoácido na pergunta pode ser a forma de L ou de D. Uma mistura de quantidades equimolares de compostos D e L é denominada racêmica e designada pelo prefixo DL, por exemplo, DL-leucina. Pode alternativamente ser designada pelo prefixo rac- (por exemplo, rac-leucina) ou pelo prefixo [+/-]. Os presentes ensinamentos incluem todos os estereoisômeros possíveis dos compostos das fórmulas I II e III assim como dos compostos específicos mostrados no presente documento.

O termo "péptido" designa no presente documento uma cadeia de duas ou mais moléculas que são ligadas por meio de uma ligação peptídica. Os péptidos podem conter um ou vários aminoácidos naturais, um ou vários aminoácidos não naturais, uma ou várias moléculas que não são aminoácidos, mas são capazes de formar ligações peptídicas, ou de misturas dos mesmos.

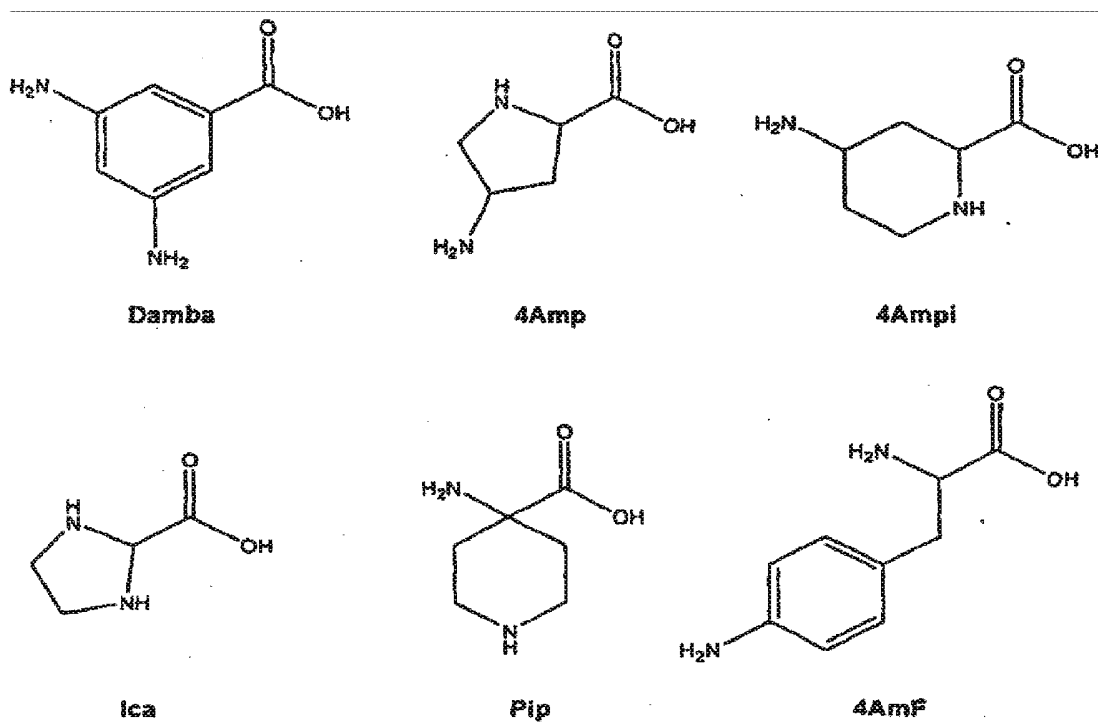
O termo "aminoácido" refere-se a uma molécula que tem a fórmula geral $\text{NHR}-\text{CHR}'-\text{COOH}$ (em que R é H e R' é uma cadeia lateral de aminoácido, ou R e R¹ juntamente com o carbono e o azoto ao qual eles estão ligados formam um anel, por exemplo, prolina) a qual é capaz de formar uma ligação peptídica com uma ou várias outras moléculas que têm a mesma fórmula geral. O termo engloba ambos aminoácidos L e D.

Um "aminoácido de ocorrência natural" refere-se a um dos seguintes 20 aminoácidos: Ala (A), Cys (C), Ser (S), Thr (T), Asp (D), Glu (E), Asn (N), Glu (Q), His (H), Arg (R), Lys (K), Ile (I), Leu (L), Met (M), Val (V), Phe (F), Tyr (Y), Trp (W), Gly (G), e Pro (P). Normalmente, estes

são L- aminoácidos, mas os presentes ensinamentos igualmente permitem a utilização de D- aminoácidos.

Como usado no presente documento, o termo "mimético de lisina" refere-se a um aminoácido não natural que compreende um anel C₅₋₆alifático ou aromático e pelo menos duas funcionalidades básicas de amina (isto é, pelo menos uma funcionalidade básica de amina além do que a N-amina terminal). Em alguns casos, a mimético de lisina tem a fórmula NHR-CHR'-COOH, onde R e R' juntamente com o carbono e o azoto ao qual eles estão ligados formam um anel de 5-6 membros, onde o anel (a) contém pelo menos um azoto de anel adicional, por exemplo, ácido imidazolidina-2-carboxílico (Ica), ou (b) carrega um substituinte amina, por exemplo, ácido amino-pirrolidina-2-carboxílico (4Amp) ou ácido amino-piperidina-2-carboxílico (4Ampi). Em outros casos, o mimético de lisina tem a fórmula NHR-CHR'-COOH onde R é H e R' é uma cadeia lateral que compreende um anel C₅₋₆alifático ou aromático, onde (a) o anel contém pelo menos um azoto de anel ou carrega um substituinte amina, e (b) o anel é separado de metileno da estrutura principal do aminoácido por 1 ou 2 átomos. Um exemplo não limitante de tal mimético de lisina é o amino-fenilalanina (4AmF), onde 1 átomo separa o anel da estrutura principal. Os miméticos de lisina podem igualmente ter a fórmula NHR-CR'R"-COOH onde R é H e R' e R" juntos formam um anel C₅₋₆alifático ou aromático, onde o anel contém pelo menos um azoto do anel ou carrega um substituinte amina. Um exemplo não limitante deste tipo de mimético de lisina é ácido 4-amino-piperidina-4-carboxílico (Pip). Igualmente incluído dentro da definição de "mimético de lisina" são aminoácidos β- e γ- não naturais que compreendem um anel C₅₋₆alifático ou aromático e pelo menos duas funcionalidades básicas de amina como descritas acima, como o ácido 3,5-diamino-benzóico (Damba). Outros miméticos de lisina são análogos

de 4-aminoprolina onde o azoto de anel prolina não está presente (por exemplo, ácido 3-aminociclopentanocarboxílico) ou está localizado em outra posição no anel prolina (por exemplo, ácido 3-aminopirrolidina-1-carboxílico ou 3-aminopirrolidina-1-carboxamida). Em qualquer dos miméticos de lisina, as funcionalidades básicas da amina podem ser um grupo amino primário (por exemplo, 4AmF, Damba, 4Ampi, e 4Amp) ou um grupo amino secundário (por exemplo, Pip e Ica). Os exemplos de miméticos de lisina têm grupos amina cíclicos alifáticos e aminas arílicas incluem Damba, 4Amp, 4Ampi, Ica, Pip, e 4AmF, que tem as seguintes estruturas:



O termo "halogénio" refere-se a F, Cl, Br, e I.

O termo "alquilo" como é usado no presente documento em separado ou como parte de um outro grupo, refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto alifática substituída ou não substituída, por exemplo, que tem 1 a 10 átomos de carbono,

que podem ser de cadeia linear ou ramificada. Os exemplos de grupos alquilo incluem metilo (Me), etilo (Et), propilo (por exemplo, n-propilo e isopropilo), butilo (por exemplo, n-butilo, isobutilo, s-butilo, t-butilo), grupos pentilo (por exemplo, n-pentilo, isopentilo, neopentilo) e similares. Incluído especificamente dentro da definição de "alquilo" são aquelas cadeias de hidrocarboneto alifáticas que são substituídas opcionalmente.

O termo "alquenilo", como é usado no presente documento em separado ou como parte de outro grupo, refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto alifática substituída ou não substituída, por exemplo, que tem de 2 a 10 átomos de carbono, que podem ser de cadeia linear ou ramificada e contêm uma ou várias ligações duplas carbono-carbono. Uma ou várias ligações duplas podem ser internas (tal como, em 2-butenos) ou terminal (tal como, em 1-butenos). Preferivelmente as porções alquenilo contêm uma ou duas ligações duplas. O termo "alquenilo" inclui ambos isômeros E e Z de cada um de uma ou várias ligações duplas. Incluído especificamente dentro da definição de "alquenilo" são aquelas cadeias de hidrocarboneto alifáticas que são substituídas opcionalmente. Os exemplos de porções alquenilo incluem vinilo, alilo, e butenilo (por exemplo, 1-butenos e 2-butenos).

O termo "alquinilo", como é usado no presente documento em separado ou como parte de outro grupo, refere-se a uma cadeia de hidrocarboneto alifática substituída ou não substituída, por exemplo, que tem 2 a 10 átomos de carbono, que podem ser de cadeia linear ou ramificada e contêm uma ou várias ligações triplas carbono-carbono. Uma ou várias ligações triplas carbono-carbono podem ser internas (tal como, em 2-butinos) ou terminal (tal como, em 1-butinos). Incluído especificamente dentro da definição de

"alquinilo" são aquelas cadeias de hidrocarboneto alifáticas que são substituídas opcionalmente. Os exemplos de grupos alquinilo incluem etinilo, propinilo, butinilo, pentinilo, e similares.

Como é usado no presente documento em separado ou como parte de um outro grupo, o termo "cicloalquilo" refere-se a grupos carbocíclicos não aromáticos substituídos ou não substituídos, por exemplo, que tem de 3 a 20 átomos de carbono de anel e opcionalmente contendo uma ou mais (por exemplo, 1, 2 ou 3) ligações duplas ou triplas, incluindo alquilo ciclizada, alquenilo, e grupos alquinilo. Os grupos cicloalquilo podem ser monocíclicos (por exemplo, ciclohexilo) ou policíclico (por exemplo, sistema de anel espiro, ou por ponte, fusionado), onde os átomos de carbono são localizados dentro ou fora do sistema do anel. Toda a posição apropriada do anel da porção cicloalquilo pode ser covalentemente ligada à estrutura química definida. Os exemplos de grupos cicloalquilo incluem ciclopropilo, ciclopropilmetilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclohexilo, ciclohexilmetilo, ciclohexiletilo, cicloheptilo, ciclopentenilo, ciclohexenilo, ciclohexadienilo, cicloheptatrienilo, norbornilo, norpinilo, norcarnilo, adamantilo, grupos espiro [4.5]decanilo, homólogos, isômeros, e similares. Igualmente são incluídas na definição de grupos cicloalquilo as porções que têm um ou mais anéis aromáticos fusionados (isto é, que tem uma ligação em comum com) ao anel cicloalquilo, por exemplo, derivados benzo de ciclopentano (indanilal), ciclohexano (tetra-hidronaftilo), e similares. Incluídos especificamente dentro da definição de "cicloalquilo" são aqueles carbociclos que são substituídos opcionalmente.

O termo "arilo", como é usado no presente documento em separado ou como parte de um outro grupo, refere-se a

hidrocarbonetos policíclicos ou monocíclicos aromáticos substituídos ou não substituídos tal como, por exemplo, fenilo, naftilo, antraceno, fenantreno, e similares. Em algumas formas de realização, os grupos arílicos têm de 6 a aproximadamente 20 átomos de carbono. Qualquer posição apropriada do anel da porção arilo pode ser covalentemente ligada à estrutura química definida (por exemplo, 1-naftilo, 2-naftilo, etc). Incluído especificamente dentro da definição de "arilo" são aqueles hidrocarbonetos aromáticos que são substituídos opcionalmente.

O termo "aralquilo" refere-se a uma porção arilo, como definido no presente documento, ligada a uma porção alquilo, como definido no presente documento. Os grupos aralquilo são ligados covalentemente à estrutura química definida através de seus grupos alquilo. Os grupos aralquilo opcionalmente podem ser substituídos na porção arilo, porção alquilo, ou ambos.

Como é usado no presente documento em separado ou como parte de um outro grupo, "cicloheteroalquilo" refere-se a um grupo cicloalquilo não aromático substituído ou não substituído, por exemplo, que tem de 3 a 20 átomos do anel, que contenha 1-4 heteroátomos de anel selecionados independentemente do oxigênio (O), azoto (N) e enxofre (S), e contém opcionalmente uma ou mais (por exemplo, 1, 2 ou 3) ligações duplas ou triplas. O grupo cicloheteroalquilo pode ser unido à estrutura química definida em qualquer heteroátomo ou átomo de carbono que resulte numa estrutura estável. Um ou mais átomos de N ou S num anel cicloheteroalquilo podem ser oxidados (por exemplo, N-hidroxipiperidina, N-óxido de morfolina, S-óxido de tiomorfolina, S,S-dióxido de tiomorfolina). Os exemplos de grupos cicloheteroalquilo incluem morfolina, tiomorfolina, pirano, imidazolidina, imidazolina, oxazolidina,

pirazolidina, pirazolina, pirrolidina, pirrolina, tetrahidrofurano, tetrahidrotiofeno, piperidina, piperazina, e similares. Igualmente são incluídas na definição de cicloheteroalquilo são porções que têm um ou mais anéis aromáticos fusionados (isto é, tem uma ligação em comum com) ao anel cicloheteroalquilo, por exemplo, benzimidazolina, cromano, cromeno, indolinotetrahydroquinolina, e similares. Os grupos cicloheteroalquilo podem igualmente conter um ou mais grupos oxo, tal como ftalimida, piperidona, oxazolidinona, pirimidina-2,4(1*H*,3*H*)-diona, piridin-2(1*H*)-ona, e similares. Incluídos especificamente dentro da definição de "cicloheteroalquilo" são aqueles sistemas do anel que são substituídos opcionalmente em qualquer heteroátomo e/ou átomo de carbono que resulte numa estrutura estável.

Como é usado no presente documento em separado ou como parte de um outro grupo, "heteroarilo" refere-se aos sistemas de anel aromáticos monocíclicos ou policíclicos que têm de 5 a 20 átomos do anel e contendo de 1-4 heteroátomos do anel selecionados independente de O, N e S. Em geral, os anéis heteroarilo não contêm ligações O-O, S-S, ou S-O. Os grupos heteroarilo incluem os anéis heteroarilo monocíclicos fusionados a um anel fenilo. O grupo heteroarilo pode ser unido à estrutura química definida em qualquer heteroátomo ou átomo de carbono que resulte numa estrutura estável. Um ou mais átomos de N ou S num anel heteroarilo podem ser oxidados (por exemplo, N-hidroxipiridina, N-óxido de piridina, S-óxido de tiofeno, S,S-dióxido de tiofeno). Os exemplos de grupos heteroarilo incluem, por exemplo, pirrol, furano, tiofeno, piridina, pirimidina, piridazina, pirazina, triazol, pirazol, imidazol, isotiazol, tiazol, tiadiazol, isoxazol, oxazol, oxadiazol, indol, isoindol, benzofurano, benzotiofeno, quinolina, 2-metilquinolina, isoquinolina, quinoxalina,

quinazolina, benzotriazol, benztetrazol, indazol, benzimidazol, benzotiazol, benzisotiazol, benzisoxazol, benzoxadiazol, benzoxazol, cinolina, 1H-indazol, 2H-indazol, indolizina, isobenzofurano, naftiridina, ftalazina, pteridina, purina, oxazolopiridina, tiazolopiridina, imidazopiridina, furopiridina, tienopiridina, piridopirimidina, piridopirazina, piridopiridazina, tienotiazol, tienoxazol, e tienoimidazol. Incluídos especificamente dentro da definição de "heteroarilo" são aqueles sistemas aromáticos do anel que são substituídos opcionalmente em qualquer heteroátomo e/ou átomo de carbono que resulte numa estrutura estável.

O termo "heterociclo" significa uma heteroarilo ou cicloheteroalquilo como definida no presente documento.

Como é usado no presente documento, "bioisótero de ácido carboxílico" significa um substituinte ou grupo que tenha as propriedades químicas ou físicas similares àquela de uma porção de ácido carboxílico e que produza de maneira ampla propriedades biológicas similares àquela de uma porção de ácido carboxílico. Veja, em geral, R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* (Academic Press, 1992). Os exemplos de bioisósteros de ácido carboxílico incluem, mas não são limitados a, amidas, sulfonamidas, ácidos sulfônicos, ácidos fosfonamídicos, fosfanatos de alquilo, N- cianoacetamidas, 3-hidroxi-4H-piran-4-ona, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, triazol, oxadiazol, tiadiazol, ou tetrazol, cada um dos quais pode ser opcionalmente substituído (por exemplo, por C₁₋₁₀ alquilo, OH, etc.).

Como é usado no presente documento, "bioisótero de amida"; significa um substituinte ou grupo que tenha as propriedades químicas ou físicas similares àquela de uma

porção amida e que produza de maneira ampla propriedades biológicas similares àquela de uma porção amida. Veja, em geral, R. B. Silverman, *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action* (Academic Press, 1992). Os exemplos de bioisósteros de amida incluem, mas não são limitados a, ácidos carboxílicos, sulfonamidas, ácidos sulfônicos, ácidos fosfonamídicos, fosfanatos de alquilo, N-cianoacetamidas, 3-hidroxi-4H-piran-4-ona, imidazol, oxazol, tiazol, pirazol, triazol, oxadiazol, tiadiazol, ou tetrazol, cada um dos quais pode ser opcionalmente substituído (por exemplo, por C₁₋₁₀ alquilo, OH, etc.).

A frase "grupo hidrofóbico" refere-se a um anel carbono aromático opcionalmente substituído, preferivelmente um anel carbono aromático de 6 a 12 membros. O grupo hidrofóbico pode ser opcionalmente substituído como discutido abaixo. Os grupos hidrofóbicos ilustrativos incluem benzilo, fenilo, e naftilo.

O termo "opcionalmente substituído" como é usado no presente documento, significa um ou mais átomos de hidrogénio (por exemplo, 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 átomos de hidrogénio) do grupo que cada um pode ser substituído com um átomo ou grupo comumente usado na química farmacêutica. Cada substituinte pode ser o mesmo ou diferente. Os exemplos de substituintes apropriados incluem, mas não são limitados a, alquilo, alquenilo, alquinilo, cicloalquilo, arilo, aralquilo, cicloheteroalquilo, heteroarilo, OR⁶ (por exemplo, hidroxilo, alcóxi (por exemplo, metoxi, etoxi, e propoxi), ariloxi, heteroariloxi, aralquiloxi, éter, éster, carbamato, etc.), hidroxialquilo, alcóxicarbonilo, alcóxialcoxi, perhaloalquilo, perfluoroalquilo (por exemplo, CF₃, CF₂CF₃), perfluoroalcóxi (por exemplo, OCF₃, OCF₂CF₃), alcóxialquilo, SR⁶ (por exemplo, tiol, alquiltio, ariltio, heteroariltio, aralquiltio, etc.), S⁺R₂⁶, S(O)R⁶,

SO_2R^6 , NR^6R^7 (por exemplo, amina primária (isto é, NH_2), amina secundária, amina terciária, amida, carbamato, uréia, etc.), hidrazida, haleto, nitrilo, nitro, sulfeto, sulfóxido, sulfona, sulfonamida, tiol, carboxi, aldeído, ceto, ácido carboxílico, éster, amida, imina, e imida, incluindo seleno e derivados tio dos mesmos, onde cada um dos substituintes ainda podem ser opcionalmente substituídos. Preferivelmente, 1-3 substituintes opcionais podem estar presentes, onde os substituintes são grupos Q como definidos no presente documento. Nas formas de realização em que um grupo funcional com um anel aromático do carbono é substituído, tais substituições numerarão tipicamente menos do que aproximadamente 10 substituições, mais preferivelmente de 1 a 5, com cerca de 1 ou 2 substituições são preferidas.

Os números de carbono usados nas definições no presente documento (por exemplo, C_{1-10} alquilo, C_{2-10} alquenilo, C_{2-10} alquinilo, C_{6-20} arilo, etc.) referem-se à estrutura principal de carbono e a ramificação de carbono, mas não inclui átomos de carbono dos substituintes.

Em vários lugares nos presentes substituintes da especificação dos compostos dos presentes ensinamentos são divulgados nos grupos ou nos intervalos. Pretende-se especificamente que os presentes ensinamentos incluam cada e toda subcombinação individual dos membros de tais grupos e intervalos. Por exemplo, o termo " C_{1-6} alquilo" é pretendido especificamente para divulgar individualmente C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , $\text{C}_1\text{-C}_6$, $\text{C}_1\text{-C}_5$, $\text{C}_1\text{-C}_4$, $\text{C}_1\text{-C}_3$, $\text{C}_1\text{-C}_2$, $\text{C}_2\text{-C}_6$, $\text{C}_2\text{-C}_5$, $\text{C}_2\text{-C}_4$, $\text{C}_2\text{-C}_3$, $\text{C}_3\text{-C}_6$, $\text{C}_3\text{-C}_5$, $\text{C}_3\text{-C}_4$, $\text{C}_4\text{-C}_6$, $\text{C}_4\text{-C}_5$, e $\text{C}_5\text{-C}_6$ alquilo. Similarmente, o termo " C_{1-10} alquilo" é pretendido especificamente para divulgar individualmente C_1 , C_2 , C_3 , C_4 , C_5 , C_6 , C_7 , C_8 , C_9 , C_{10} , $\text{C}_1\text{-C}_{10}$, $\text{C}_1\text{-C}_9$, $\text{C}_1\text{-C}_8$, $\text{C}_1\text{-C}_7$, $\text{C}_1\text{-C}_6$, $\text{C}_1\text{-C}_5$, $\text{C}_1\text{-C}_4$, $\text{C}_1\text{-C}_3$, $\text{C}_1\text{-C}_2$, $\text{C}_2\text{-C}_{10}$, $\text{C}_2\text{-C}_9$, $\text{C}_2\text{-C}_8$,

C₂-C₇, C₂-C₆, C₂-C₅, C₂-C₄, C₂-C₃, C₃-C₁₀, C₃-C₉, C₃-C₈, C₃-C₇, C₃-C₆, C₃-C₅, C₃-C₄, C₄-C₁₀, C₄-C₉, C₄-C₈, C₄-C₇, C₄-C₆, C₄-C₅, C₅-C₁₀, C₅-C₉, C₅-C₈, C₅-C₇, C₅-C₆, C₆-C₁₀, C₆-C₉, C₆-C₈, C₆-C₇, C₇-C₁₀, C₇-C₉, C₇-C₈, C₈-C₁₀, C₈-C₉, e C₉-C₁₀ alquilo.

Os compostos dos presentes ensinamentos podem conter um átomo assimétrico (igualmente referido como um centro quiral), e alguns dos compostos podem conter um ou mais átomos ou centros assimétricos, que podem assim causar isómeros óticos (enantiómeros) e diastereómeros. Os presentes ensinamentos incluem tais enantiómeros e diastereómeros, assim como os estereoisómeros racémicos e resolvidos, enantiomericamente puros R e S, assim como outras misturas dos estereoisómeros R e S e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Os isómeros óticos podem ser obtidos na forma pura pelos procedimentos padrão conhecidos àqueles versados na técnica, que incluem, mas não são limitados a, formação diastereomérica de sal, definição cinética, e síntese assimétrica. Os presentes ensinamentos igualmente englobam isómeros eis e trans de compostos contendo porções alqueno (por exemplo, alcenos e iminas). Igualmente compreende-se que os presentes ensinamentos abrangem todos os regioisómeros possíveis, e as misturas dos mesmo que podem ser obtidas na forma pura pelos procedimentos padrão da separação conhecidos àqueles versados na técnica, e para incluir, mas não são limitados a, cromatografia de coluna, cromatografia de camada fina, e cromatografia líquida de capacidade elevada.

Os termos "modulador de comunicação intercelular", "facilitador de junção comunicante", "composto que facilita a comunicação de junção comunicante" e "abridor de junção comunicante", etc., todos referem-se a um composto que facilita, ou mantém, ou normaliza, uma comunicação intercelular da junção comunicante (GJIC),

independentemente do mecanismo particular atrás desta ação. Mais especificamente, o termo "abridor de junção comunicante" pode referir-se a uma substância que normalize (isto é, aumentos) a troca das moléculas que podem passar através das junções comunicantes entre espaços extracelulares e intracelulares e/ou que podem normalizar ou aumentar GJIC.

O termo "agonista" refere-se a um composto que possa interagir com um tecido, uma célula ou uma fração de célula que seja o alvo de um composto AAP, AAP10, ou HP5 (ou do análogo funcional do mesmo), para causar substancialmente as mesmas respostas fisiológicas no tecido, célula ou fração de célula como o composto AAP, AAP10, ou HP5 (ou análogo funcional do mesmo). Num aspeto, a resposta fisiológica é uma ou várias da contração, relaxamento, secreção, ativação da enzima, etc. Preferivelmente, o composto se liga ao tecido, célula ou fração de célula. Num aspeto, o composto se liga a um recetor no tecido, célula, fração de célula, que se liga a AAP, AAP10, ou HP5 (ou um análogo funcional do mesmo).

O termo "antagonista" refere-se a um composto que iniba ou antagonize uma ou mais respostas fisiológicas observadas num tecido, célula ou fração de célula após ter contactado o tecido, célula, ou fração de célula com o composto AAP, AAP10, ou HP5 (ou análogo funcional do mesmo). Num aspeto, a resposta fisiológica é uma ou mais de contração, relaxamento, secreção, ativação da enzima, etc. Preferivelmente, o composto se liga ao tecido, célula ou fração de célula. Num aspeto, o composto se liga a um recetor no tecido, célula, ou fração de célula que se ligam à AAP, AAP10, ou HP5 (ou análogo funcional do mesmo) e/ou que inibe o emperramento de um ou mais do análogo de AAP, AAP10, ou HP5 (ou análogo funcional do mesmo) ao recetor.

Como é usado no presente documento, "normalizar" refere-se a uma mudança numa resposta fisiológica tal que a resposta se torna insignificamente diferente de uma observada num paciente normal. Assim, a normalização pode envolver um aumento ou uma diminuição na resposta dependendo da patologia envolvida.

B. Compostos Exemplares

Os compostos exemplares de acordo com os presentes ensinamentos estão listados abaixo. Em alguns casos, os nomes alternados para os compostos são incluídos entre parênteses após o nome químico.

Composto 1: ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(4-Nitrobenzoyl)-OH)

Composto 2: ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico, H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(Benzoyl)-OH)

Composto 3: ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(4-metilbenzoyl)-OH)

Composto 4: ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(4-metoxibenzoil)-OH)

Composto 10: ácido (2S,4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-hidroxibenzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S, 4R)-4Amp(4-hidroxibenzoil)-OH)

Composto 11: ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4S)-4Amp(4-metoxibenzoil)-OH)

Composto 12: ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4S)-4Amp(4-metilbenzoil)-OH)

Composto 13: ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4S)-4Amp(4-nitrobenzoil)-OH)

Composto 14: ácido (2S,4S) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (H-Gly-(2S,4S)-4Amp(benzoil)-OH)

Composto 18: ácido (2S,4S) 1-(2-Amino-acetil)-4-benzoilamino-piperidine-2-carboxílico (H-Gly-(2S4S)-4Ampi(Benzoil)-OH)

Composto 64: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxamida

Composto 65: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 66: (2S,4R) 1-(2-aminaacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 67: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 68: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 69: (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxamida

Composto 70: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida

Composto 71: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 72: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 73: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 74: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida

Composto 76: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-3-metilbutan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida

Composto 77: (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-3,3-dimetilbutan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida

Composto 80: ácido (2S,4R) 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico

Composto 81: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)-pirrolidina-2-carboxílico

Composto 82: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 83: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxílico

Composto 85: ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-formamidoacetil)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 93: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(2-fluorobenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 94: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-fluorobenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 95: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-fluorobenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 96: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(2-metilbenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 97: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-metilbenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 98: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-metilbenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 99: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-metoxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 100: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-metoxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 101: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(4-hidroxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Composto 102: ácido (2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-(3-hidroxibenzamido)pirrolidina-2-carboxílico

Os presentes ensinamentos abrangem também isômeros e/ou enantiômeros dos compostos listados acima (por

exemplo, 2S4S, 2S4R, 2R4R, 2R4S, 3S5S, 3S5R, 3R5R, 3R5S), assim como seus sais e hidratos.

Sais farmacologicamente aceitáveis dos compostos dos presentes ensinamentos que têm uma porção ácida podem ser formados usando bases orgânicas e inorgânicas. Os sais apropriados formados com bases incluem sais de metal, tais como sais de metal alcalino ou alcalino terroso, por exemplo, sais de sódio, potássio, ou magnésio; os sais de amônia e sais de amina orgânica, tais como aqueles formados com morfolina, tiomorfolina, piperidina, pirrolidina, mono-, di- ou trialkilamina de cadeia curta (por exemplo, etil-, terc-butil-, dietil-, diisopropil-, trietil-, tributil- ou dimetilpropilamina), ou mono-, di-, ou tri-hidroxialquilamina de cadeia curta (por exemplo, mono-, di- ou trietanolamina). Os sais internos também podem ser formados. De maneira similar, quando um composto dos presentes ensinamentos contém uma porção básica, os sais podem ser formados usando ácidos orgânicos e inorgânicos. Por exemplo, os sais podem ser formados dos seguintes ácidos: acético, propiônico, láctico, cítrico, tartárico, succínico, fumárico, maléico, malônico, mandéico, málico, ftálico, clorídrico, bromídrico, fosfórico, nítrico, sulfúrico, metanossulfônico, naftalenossulfônico, benzenossulfônico, toluenossulfônico, e canforsulfônico assim como outros ácidos farmacologicamente conhecidos. Os sais de adição de aminoácido podem igualmente ser formados com aminoácidos tais como lisina, glicina, ou fenilalanina.

Também se revelam pró-fármacos dos compostos descritos no presente documento. Como é usado no presente documento, "pró-fármaco" refere-se a uma porção que produza, gere ou liberte um composto dos presentes ensinamentos quando administrado a um indivíduo mamífero. Os pró-fármacos podem ser preparados por meio da modificação dos grupos

funcionais presentes nos compostos de tal maneira que as modificações são clivadas, ou por manipulação de rotina ou *in vivo*, dos compostos de origem. Os exemplos dos pró-fármacos incluem compostos dos presentes ensinamentos como descritos no presente documento que contêm uma ou mais porções moleculares adicionadas a um grupo hidroxilo, amino, sulfidrilo, ou carboxilo do composto, e que quando administrados a um indivíduo mamífero, são clivados *in vivo* para formar o grupo hidroxilo, amino, sulfidrilo, ou carboxilo livre, respectivamente. Os exemplos dos pró-fármacos incluem, mas não são limitados a, derivados de acetato, formiato e benzoato do álcool e aminas funcionais nos compostos dos presentes ensinamentos. Os exemplos de pró-fármacos preferidos incluem pró-fármacos de oxazolidinona ou imidazolidinona. Os pró-fármacos de éster são formados preferivelmente com álcoois de cadeia curta, tais como os C₁₋₈ álcoois. A preparação e a utilização dos pró-fármacos são discutidas em T. Higuchi e V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems", Vol. 14 de A.C.S. Symposium Series, e em Bioreversible Carriers in Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987.

Também se revelam derivados dos compostos, e mais particularmente formas protegidas dos compostos. Como meio de exemplo, os compostos podem ser protegidos em N- e/ou C-terminal, e/ou em cadeia lateral de aminoácido (naqueles compostos onde R¹ é uma cadeia lateral de aminoácido). Os exemplos de grupos de proteção incluem tBu, Boc, Fmoc, Fm, Benzilo, Dde e Z e incluem também os compostos quando acoplados a uma fase contínua, por exemplo quando foram feitos pela síntese da fase contínua.

C. Composições Farmacêuticas

Os compostos dos presentes ensinamentos podem servir como medicamento em sua forma pura ou como composições farmacêuticas, que podem ser administradas através de qualquer método aceitável conhecido na técnica, individualmente ou em combinação. As composições farmacêuticas de acordo com os presentes ensinamentos podem compreender um composto dos presentes ensinamentos na adição de mistura com um ou mais portadores, diluentes, veículos ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis. Tais composições podem ser formuladas à administração oral (incluindo a cavidade bucal ou sublingual) ou pela administração parentérica (incluindo administração intravenosa (i.v.), subcutânea (s.c), intramuscular (i.m.), intraperitoneal (i.p.)). Outras vias de administração incluem a administração epidural, retal, intranasal ou cutânea ou pela inalação pulmonar. Especialmente as formulações preferidas proporcionam a libertação sustentada dos compostos dos presentes ensinamentos. As composições são preferivelmente sob a forma de formulações sólidas ou líquidas e os métodos para sua preparação são descritos em geral em "Remington's Pharmaceutical Sciences", 17ª Ed., Alfonso R. Gennaro (Ed.), Marca Publishing Company, Easton, PA, EUA, 1985.

Tais composições contêm em geral uma quantidade eficaz de um ou mais compostos ativos dos presentes ensinamentos, juntamente com um portador apropriado a fim de fornecer a dosagem numa forma compatível com a via de administração selecionada. Preferivelmente, o portador está na forma de um veículo, um diluente, um agente de tamponamento, um agente de ajuste de tonicidade, um conservante e estabilizadores. Os excipientes que constituem o portador devem ser compatíveis com o ingrediente ou ingredientes

farmaceuticamente ativos e são preferivelmente capazes de estabilizar os compostos sem ser deletérios ao indivíduo que está a ser tratado.

Uma forma de formulação de libertação sustentada ou repositório pode ser usada de modo que as quantidades terapeuticamente eficazes da preparação sejam libertadas na circulação sanguínea ao longo de muitas horas ou dias que se seguem a administração do composto ou composição, por exemplo, pela injeção ou deposição transdérmica. As formulações apropriadas para a libertação sustentada incluem polímeros biodegradáveis, tais como ácido L-láctico, ácido D-láctico, ácido DL-láctico, glicólido, ácido glicólico, e isómeros dos mesmos. De maneira similar, o portador ou o diluente pode incluir qualquer material de libertação sustentada conhecido na técnica, tal como monoestearato de glicerilo ou o diestearato de glicerilo, em separado ou misturado com uma cera.

Outras formulações de libertação sustentada podem incluir, mas não são limitadas a, formulações que incluem pelo menos um dos compostos divulgados combinados nisto com lipossomos, microesferas, emulsões ou micelas e estabilizadores líquidos.

As doses dos compostos e das composições dos presentes ensinamentos requerem para os efeitos terapêuticos desejados e dependerão da potência do composto, da composição particular usada e da via de administração selecionada. Os compostos serão administrados tipicamente na faixa de 0,001 g a 10 g por paciente por dia. Por exemplo, os compostos podem ser administrados na faixa de aproximadamente 1 mg a cerca de 1000 mg por paciente por dia, de aproximadamente 10 mg a cerca de 100 mg por paciente por dia, ou cerca de 50 mg por paciente por dia.

O regime de dose mais apropriado pode melhor ser determinado por um médico com experiência, para cada paciente individualmente. O ótimo regime de dose com os compostos e as composições farmacêuticas de acordo com os presentes ensinamentos, depende dos fatores tais como a doença ou a desordem particular que estão a ser tratados, o efeito desejado, e a idade, o peso ou o índice de massa corporal, e as condições físicas gerais do paciente. A administração pode ser conduzida numa forma farmacêutica única para aliviar sintomas agudos ou como uma terapia contínua sob a forma das doses múltiplas sobre o tempo. Alternativamente, os sistemas contínuos da infusão ou formulações depot de libertação lenta podem ser utilizados. Dois ou mais compostos ou composições farmacêuticas de acordo com os presentes ensinamentos podem ser coadministrados simultaneamente ou sequencialmente em qualquer ordem. Além disso, os compostos e as composições podem ser administrados numa maneira similar para finalidades profiláticas. Finalmente, o melhor regime de dosagem será decidido pelo médico de plantão para cada paciente individualmente.

D. Utilizações Terapêuticas

Os compostos de acordo com os presentes ensinamentos, podem facilitar e/ou manter a comunicação intercelular negociada por junções comunicantes. Num aspeto, os compostos de acordo com os presentes ensinamentos direcionam-se às mesmas células alvo por AAP, AAP10, HP5, e/ou por análogos funcionais das mesmas, isto é, os compostos são capazes de modular a função destas células agonizando ou antagonizando a função de AAP, AAP10, HP5, e/ou análogos funcionais dos mesmos. O âmbito dos presentes ensinamentos, entretanto, não é limitado aos compostos que têm propriedades agonísticas ou antagonísticas específicas

de AAP. Os presentes ensinamentos igualmente referem-se à preparação e à utilização de composições farmacêuticas para o tratamento das patologias que podem ser associadas com uma comunicação de junção comunicante intercelular danificada e métodos para usar estas composições, por exemplo, como divulgado no documento WO 02/077017 "New Medical Uses of Intercellular Communication Facilitating Compounds".

Descrevem-se no presente documento métodos de tratamento de um indivíduo que tem, ou prevenção que um indivíduo em risco desenvolva, uma condição associada com GJIC prejudicado (por exemplo, arritmia cardíaca ou osteoporose) que compreende administrar uma quantidade terapêuticamente eficaz de alguns dos compostos dos presentes ensinamentos. Os indivíduos que podem ser tratados usando compostos de acordo com os presentes ensinamentos incluem, mas não são limitados a, animais, preferivelmente mamíferos, por exemplo, roedores (que incluem ratinhos, ratos, hamster, e lagomorfos, tais como coelhos), cães, porcos, cabras (em geral algum animal doméstico), e primatas. Num aspeto preferido, o indivíduo é ser humano.

Os exemplos das condições que podem ser tratadas ou prevenidas usando os compostos dos presentes ensinamentos incluem, mas não são limitados a, doença cardiovascular; osteoporose; inflamação do epitélio da via aérea; distúrbios do tecido alveolar; incontinência da bexiga; audição prejudicada (por exemplo, devido às doenças da cóclea); lesões endoteliais; diabetes (Tipo I ou Tipo II) e complicações diabéticas (incluindo a retinopatia diabética e neuropatia diabética); arteriosclerose; condições relacionadas ao CNS; apreensões; isquemia (por exemplo, isquemia do sistema nervoso central, da medula espinhal, do

cérebro ou da haste do cérebro); distúrbios dentais do tecido (que incluem a doença periodontal); doenças do rim; manifestações hematológicas (por exemplo, anemia, leucopenia, trombocitopenia, e pancitopenia, especialmente seguindo tratamento com compostos citos- táticos ou terapia da irradiação); traumatismo resultante das feridas (por exemplo, feridas superficiais e feridas profundas); fratura de osso; disfunção erétil; incontinência da bexiga urinária; dor neuropática; inflamação subcrónica e crónica; câncer; falha de transplante da medula e da célula de haste; condições que se levantam durante a transplantação das células e dos tecidos ou durante procedimentos médicos tais como a cirurgia; condições causadas por um excesso de espécie reativa do oxigénio e/ou de radical livre e/ou óxido nítrico; doenças ou distúrbios da gravidez (por exemplo, pré-eclampsia e trabalho prematuro); infertilidade feminina; e acidente vascular cerebral. Os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem igualmente ser usados para induzir o trabalho (por exemplo, facilitando o efeito de oxitocina na contração do útero).

Num aspeto preferido, os presentes ensinamentos proporcionam um composto antiarrítmico farmacologicamente ativo para o tratamento ou a prevenção das arritmias e complicações trombóticas que levantam-se durante distúrbios cardiovasculares, tais como a doença cardíaca isquémica aguda (por exemplo, angina pectoris estável, angina pectoris instável, infarto do miocárdio agudo), parada cardíaca congestiva (por exemplo, sistólicas, diastólicas, parada cardíaca de rendimento elevado, a rendimento baixo, no lado direito ou esquerdo), doenças cardíacas congénitas, pulmonar do núcleo, cardiomiopatia, miocardite, doença cardíaca hipertensiva, durante a revascularização coronária, e similares. Em formas de realização específicas, os compostos de acordo com os

presentes ensinamentos podem ser usados para tratar e/ou prevenir as bradiarritmias (por exemplo, devido à doença no nó da cavidade, nó do AV, feixe de His, ramificação direita ou esquerda do feixe), e as taquiarritmias associadas com a reentrada (por exemplo, complexos prematuros atrial, complexos conectivos de AV, complexos prematuros ventriculares, fibrilação atrial, vibração atrial, taquicardia supraventricular paroximal, taquicardia reentrante do nó da cavidade, taquicardia reentrante nodal de AV, e taquicardia ventricular não sustentada). Além disso, os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem ser úteis no alívio de uma condição patológica onde o retardamento da velocidade da condução é um fator importante, por exemplo, taquicardia ventricular, fibrilação ventricular, e fibrilação atrial. Os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com outros compostos antiarrítmicos, tais como agentes de classe III (por exemplo, lidocaína), agentes de classe II (por exemplo, metoprolol ou propranolol), agentes de classe III (por exemplo, amiodarona ou sotalol) ou agentes de classe IV (por exemplo, verapamil).

Os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem igualmente ser usados para tratar ou prevenir uma ou mais arritmias da reentrada, da cardiomiopatia ventricular da reentrada (por exemplo, aparecimento durante o infarto miocárdio agudo, o infarto miocárdio crônico, a angina pectoris estável e a angina pectoris instável), a infecciosa ou a automática, fibrilação atrial, alternância de repolarização, taquicardia ventricular monomófica, alternância de onda T, bradiarritmias, contratilidade reduzida do tecido cardíaco, trombose, e similares.

As funções adicionais em que uma comunicação

intercelular de abertura-conectiva endotelial foi implicada são o comportamento migratório de células endoteliais após ferimento, angiogênese, crescimento e senescência endotelial e a coordenação de respostas vasomotoras (Christ *et al.* Braz. J Med Biol. Res., 33, 423-429 (2000)). Consequentemente, os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem ser usados para realçar respostas vasculares conduzidas e para melhorar a fonte de sangue durante condições com demanda metabólica aumentada (por exemplo, exercício físico, taquicardia), e durante a isquemia.

Os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem ser usados para citoproteger um tecido ou órgão de um mamífero na necessidade de tal tratamento. Citoproteção refere-se à diminuição, prevenção ou alívio dos sintomas associados com o inchamento não desejado da célula. Os tecidos e os órgãos particulares que tirarão proveito do método incluem aqueles confinados ou impactados de outra maneira por uma cápsula fibrosa tal como o coração ou o rim. Igualmente são incluídos os tecidos associados com o osso tal como o cérebro, a medula e a medula espinhal. Os compostos dos presentes ensinamentos podem ser usados para prevenir ou tratar ferimento isquêmico nos órgãos de um mamífero com necessidade de tal tratamento, incluindo, por exemplo, do coração, do sistema nervoso central, do rim, do aparelho gastrointestinal, do fígado, dos pulmões, e dos membros.

Descreve-se no presente documento a utilização dos compostos para tratar ou prevenir as manifestações hematológicas que seguem o tratamento com os compostos citostáticos ou a terapia da irradiação. A recuperação danificada da hematopoese é observada nos pacientes após o tratamento citostático 5-fluorouracilo (5-FU). Isto inclui

a ausência de recuperação de contagens de sangue periféricas, incluindo neutropenia severa, anemia severa com reticulocitopenia e a presença de eritrócitos periféricos anormais e de trombocitopenia severa. Além, 5-8 dobras diminuem a celularidade da medula óssea e do índice hematopoético progenitor (formação de unidades granulomacrofágicas da colônia (CFU-GM), o estouro eritróide de formação de unidade (BFU-E), as unidades de formação colônias misturadas (mistura CFU), e as unidades de formação colônias totais (CFU- C) na medula óssea são observados. (Veja, por exemplo, Montecino- Rodriguez et al., Blood, 96, 917-924, (2000); Presley et al., Abstract N° 55, IGJC 2005, Whistler, Canadá (2005)). São incluídos neste aspeto dos presentes ensinamentos o tratamento ou a prevenção das situações clínicas gerais comumente associadas ao pancitopenia iatrogénico.

Os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem ser usados para tratar ou prevenir a osteoporose. Sabe-se que esse GJIC é importante na formação do osso. A eficácia dos compostos pode ser avaliada, por exemplo, por um aumento na atividade do osteoblasto num ensaio padrão da atividade do osteoblasto que meça ou a formação da onda do cálcio e/ou a atividade da fosfatase alcalina de células do osteoblasto na presença dos compostos. A atividade da fosfatase alcalina igualmente pode ser usada para fornecer uma medida da atividade do osteoblasto usando ensaios colorimétricos padrão.

Preferivelmente, um ou mais dos compostos ou composições farmacêuticas de acordo com os presentes ensinamentos são administrados a um indivíduo na necessidade disso numa quantidade terapêutica eficaz. Como é usado no presente documento, "uma quantidade terapeuticamente eficaz" refere-se a uma quantidade que

reduz sintomas de uma dada condição ou de uma patologia, e preferivelmente que normalize respostas fisiológicas num indivíduo com a condição ou a patologia. A redução dos sintomas ou a normalização de respostas fisiológicas pode ser determinada utilizando métodos rotineiros na técnica e podem variar com uma dada condição ou patologia. Num aspeto, uma quantidade terapeuticamente eficaz de um ou mais compostos ou composições farmacêuticas é uma quantidade que restaura um parâmetro fisiológico mensurável substancialmente ao mesmo valor (preferivelmente dentro de $\pm 30\%$, mais preferencialmente dentro de $\pm 20\%$, e ainda mais preferencialmente dentro de $\pm 10\%$ do valor) do parâmetro num indivíduo sem a condição ou a patologia.

A quantidade eficaz será determinada pelo perito na especialidade levando em consideração fatores como a potência do fármaco, idade e constituição do paciente, peso corporal, perfil farmacocinético do fármaco, e em geral o fármaco será prescrito para cada paciente ou grupo de pacientes. Entretanto, a quantidade eficaz do composto pode estar pelo menos a um peso corporal de aproximadamente 10 $\mu\text{g/kg/dia}$, tal como pelo menos o peso corporal de aproximadamente 100 $\mu\text{g/kg/dia}$, pelo menos o peso corporal de aproximadamente 300 $\mu\text{g/kg/dia}$, e pelo menos o peso corporal de aproximadamente 1000 $\mu\text{g/kg/dia}$. De um outro lado, a quantidade eficaz do composto ou do dímero pode ser no máximo aproximadamente 100 mg/kg/dia de peso corporal, tal como no máximo aproximadamente 50 mg/kg/dia de peso corporal e no máximo aproximadamente 10 mg/kg/dia de peso corporal. Espera-se que a quantidade eficaz do composto esteja a um peso corporal de aproximadamente 100 $\mu\text{g/kg/dia}$, a um peso corporal previsto de aproximadamente 300 $\mu\text{g/kg/dia}$ ou peso corporal de aproximadamente 1000 $\mu\text{g/kg}$.

E. Ensaios Biológicos

Os compostos preferidos dos presentes ensinamentos podem mostrar ligação, preferivelmente ligação específica, a um tecido, a uma célula, ou a uma fração de célula em que é referido no presente documento como um "teste de ligação do local padrão de AAP". O teste pode detetar e opcionalmente quantificar a ligação de um composto indivíduo, por exemplo, AAP, AAP10, HP5, ou um análogo funcional disso. Numa forma de realização preferida, o composto pode ser um modulador da função de tal tecido, célula, ou fração de célula (isto é, o composto agoniza ou antagoniza a função do péptido antiarrítmico). Em outra forma de realização, o composto pode ser um modulador de um recetor para o péptido antiarrítmico (isto é, o composto é um agonista ou um antagonista do recetor). Os compostos adicionalmente preferidos de acordo com os presentes ensinamentos podem mostrar a boa função como moduladores de uma comunicação conectiva da abertura (por exemplo, como os agonistas ou os antagonistas de AAP). Num aspeto, os compostos podem funcionar como fármacos antiarrítmicos.

Os compostos preferidos do agonista dos presentes ensinamentos podem fornecer uma condutibilidade intracelular (Gj) que seja substancialmente a mesma como, ou sejam maiores do que, o Gj de AAP em que é referido no presente documento como um "ensaio cardiomiócito padrão". Os compostos antagonista preferidos podem fornecer um Gj que seja menos (por exemplo, pelo menos aproximadamente 10%, ou pelo menos aproximadamente menos de 20%) do que o Gj de AAP e/ou obstruir a habilidade de AAP de normalizar o Gj de uma célula isquémica, isto é, para retornar substancialmente o Gj aos mesmos valores encontrados em células não isquémicas. Os compostos adicionalmente preferidos de acordo com os presentes ensinamentos podem

aumentar o tempo a um bloco de AV num ratinho após a infusão de CaCl_2 , em que é referido no presente documento como um "ensaio de arritmia induzido por cálcio padrão". Os compostos dos presentes ensinamentos podem prevenir a condução cardíaca que retarda na presença de várias formas do estresse metabólico (por exemplo, isquemia, hipoglicemia ou acidez) em que é referido no presente documento como um "modelo da tira atrial isolada padrão de estresse metabólico induzido por lenta condução". Os compostos dos presentes ensinamentos podem adicionalmente mostrar diminuições na incidência de arritmias da reentrada ou no tamanho de uma zona do enfarte observada em que é referido no presente documento como um "ensaio de reentrada ventricular padrão".

Em algumas formas de realização, os compostos dos presentes ensinamentos podem exibir uma boa semivida de acordo com o que é referido no presente documento como um "ensaio de estabilidade de plasma *in vitro*". Os compostos que mostram uma boa estabilidade no ensaio têm numa forma de realização uma semivida de mais do que aproximadamente 48 horas, ou mais de 24 horas, ou mais de 12 horas, ou mais de 6 horas, ou mais de 3 horas, ou mais de 1 hora, ou mais de 30 minutos, ou mais de 20 minutos, ou mais de 15 minutos, ou mais de 10 minutos, ou mais de 5 minutos, ou mais de 1 minuto. Nestas formas de realização, os compostos dos presentes ensinamentos podem mostrar a estabilidade realçada na circulação sanguínea.

Os ensaios particulares úteis para identificar e opcionalmente determinar a atividade dos compostos dos presentes ensinamentos são adicionalmente descritos abaixo.

1. Ensaio padrão de estabilidade de plasma

Descrevem-se no presente documento compostos que possuem estabilidade aumentada *in vitro* ou *in vivo*. Como exemplo, os compostos dos presentes ensinamentos que compreendem uma ligação de péptido podem ser alquilados ou de outra maneira modificados para estabilizar o composto contra degradação enzimática. Alternativamente ou adicionalmente, os compostos podem compreender um ou mais aminoácidos D. É possível testar se um composto possui estabilidade aumentada num ensaio padrão da estabilidade.

Num exemplo de um ensaio de estabilidade de plasma *in vitro*, os compostos são incubados em plasma ou soro e amostras são tomadas em intervalos regulares para análise por HPLC ou LC/MS/MS, para quantificar o teor de composto não degradado. (Veja-se, por exemplo, documento WO 02/077017, a descrição inteira do qual é incorporada por referência no presente documento). As condições apropriadas (coluna, solvente, gradiente e temperatura) para tal análise são estimadas para assegurar que o pico do composto e os picos do plasma não tenham o mesmo tempo de retenção. Isto é feito por injeções subsequentes de um composto, plasma e uma coinjeção com o composto e o plasma, seguidos pela otimização de parâmetros do método LC até que uma separação satisfatória seja obtida. Uma amostra de plasma de controlo sem o composto de péptido, tratada da mesma maneira, igualmente é tomada e avaliada. As amostras podem incluir, mas não são limitadas a, um branco, o composto a uma concentração apropriada (por exemplo, 0,1 mg/ml), plasma sem composto, uma ou mais amostras para $t = 0$ e uma ou mais amostras em cada intervalo regular. Preferivelmente, amostras múltiplas são tomadas em paralelo. As concentrações de amostra (altura de pico em mAU ou contagens de ião) são traçadas contra o tempo e

adequadas para uma função que descreve um decaimento monoexponencial (por exemplo, usando um pacote padrão Excel). Preferivelmente, um composto de acordo com os presentes ensinamentos tem uma meia vida de mais do que aproximadamente 30 minutos (por exemplo, mais do que aproximadamente 1 hora, ou mais do que aproximadamente 3 horas, ou mais do que aproximadamente 6 horas, ou mais do que aproximadamente 12 horas, ou mais do que aproximadamente 24 horas, ou mais do que aproximadamente 48 horas) como determinado usando este ensaio.

A estabilidade em plasma pode ser examinada *in vivo* usando ensaios padrão. Por exemplo, os compostos podem ser administrados a um mamífero, tal como um ratinho, por injeções de bolus em volumes de aproximadamente 1 ml/kg tanto para dosagem i.v. quanto p.o. Preferivelmente, os compostos são testados paralelamente às amostras de controlo tais como tampão ou um péptido antiarrítmico com uma estabilidade conhecida. As amostras de sangue são coletadas em períodos de tempo diferentes (por exemplo, em B.D. 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 e 240 minutos, onde B.D. refere-se a antes da dose). As quantidades de compostos nas amostras podem ser determinadas usando métodos de rotina na arte, tal como LC/MS/MS. Por exemplo, as concentrações de compostos em amostras de plasma podem ser calculadas de uma curva padrão externa cobrindo os intervalos de concentração do composto de 1,00 a 1000 nM. As concentrações de plasma contra dados de tempo podem ser usadas para modelagem farmacocinética em WinNonLin 3.5 (Pharsight, Mountain View, CA) usando análise não compartimentada e os parâmetros resultantes de AUC, F_{po} , Cl_b , $t_{1/2}$, C_{max} e t_{max} podem ser determinados como é conhecido na técnica.

2. Ensaios padrão de cardiomiócito

Os compostos dos presentes ensinamentos podem ser testados num ensaio de cardiomiócito, que meça a função da junção da abertura de células cardíacas após administração dos compostos. Num exemplo, as células cardíacas são isoladas de um mamífero, tal como corações de uma cobaia, por perfusão com collagenase de acordo com o método de Langendorf. As células são expostas ao composto e avaliadas quanto a GJIC por técnica de "patch clamp" usando métodos conhecidos na técnica. A condutância intercelular (Gj) é calculada usando a fórmula:

$$G_j = \frac{\Delta I_p}{\Delta U_j} = \frac{I_{p,pulso} - I_{p,repouso}}{U_p - U_a}$$

(Equação 1)

onde $I_{p,pulso}$ e $I_{p,repouso}$ representam a corrente na célula passiva durante o pulso e antes do pulso respetivamente, e U_p e U_a representam a tensão da célula passiva e ativa. A mudança no valor de Gj mediante administração do composto é analisada comparando as mudanças relativas em Gj. Por exemplo, o Gj relativo como uma função do tempo antes e durante estimulação com composto (por exemplo, a aproximadamente 10^{-8} M) pode ser determinado. Preferivelmente, o composto fornece uma Gj que é substancialmente a mesma que a Gj ($\pm 10\%$) de um péptido antiarrítmico, tal como AAP, A- AP10, HP5 e análogos funcionais do mesmo. Num exemplo, a célula é uma célula isquémica e o composto fornece uma Gj que é substancialmente a mesma como aquela de uma célula não isquémica ($\pm 20\%$, preferivelmente, $\pm 10\%$). Detalhes adicionais a respeito de execução de ensaios de cardiomiócito são proporcionados no documento WO 02/077017.

3. Ensaio padrão de arritmia induzida por cálcio

Péptidos apropriados para administração a células cardíacas podem ser identificados num modelo *in vivo* de arritmias induzidas por cálcio de acordo com o modelo de Lynch et al. (1981) J Cardiovasc. Pharmacol. 3:49 - 60, Ratinhos machos CD-1 são anestesiados com Cetamina (75 mg/kg) e medetomidina (1 mg/kg) IP. Uma cânula i.v. é introduzida na veia da cauda. Um sinal de ECG da derivação II é registado continuamente posicionando elétrodos de aço inoxidável de ECG sobre o membro frontal direito e o membro frontal esquerdo. O elétrodo de terra é colocado no membro traseiro direito. O sinal é amplificado e filtrado usando componentes do fisiógrafo Gould e o software de aquisição de dados po-ne-mah. Após um período de equilíbrio de 90 segundos o composto de teste é injetado na veia-se da cauda (durante 30 segundos). Os ratinhos pré-tratados com veículo são testados como animais de controlo. O volume de injeção é de 100 µl/ratinho de 30 g em todas as experiências. Infusão de CaCb (30 mg/ml, 0,1 ml/min/ratinho de 30 g, 100 mg/kg/min) é começada 3 minutos após administração IV de fármaco ou veículo (solução salina a 0,9%). O retardo de tempo para o início do bloco de condução cardíaco é determinado como o tempo do começo da infusão de CaCl₂ até o primeiro evento arritmico ocorrido. O primeiro bloco de condução é definido como o primeiro intervalo RR, maior do que ou igual a 3 vezes um intervalo RR do período do pré-tratamento. O primeiro evento arritmico ocorrido é um bloco AV de segundo grau (falha intermitente da condução de AV caracterizada por uma onda P sem o complexo concomitante de QRS) ou um bloco AS de segundo grau (intervalo RR prolongado e um complexo QRS sem uma onda P precedente). As respostas são expressas com relação ao tempo até o bloco AV de 2º grau ocorrido em ratinhos tratados com veículo.

4. Modelo de tira atrial isolada padrão de diminuição de condução induzida por stress metabólico

Os péptidos apropriados para administração às células cardíacas podem ser identificados num modelo *in vitro* como descrito por Haugan *et al.* (J. Cardiovasc. Electrophysiol., 16, 537-545 (2005)).

Ratos (300-400 g) são mortos por um golpe agudo no pescoço. O coração é extirpado rapidamente e transferido para um prato pequeno contendo tampão Tyrodes modificado oxigenado 37° contendo (em mM): NaCl 136, KCl 4, MgCl₂ 0,8, CaCl₂ 1,8 HEPES 5, MES 5, glicose 6, pH 7,3. O átrio esquerdo é dissecado com cuidado e uma amostra de tecido de 2x6 milímetros aproximadamente é retirada do apêndice atrial esquerdo e colocada numa câmara de tecido (volume de 5 ml) (Steiert Organ Bath, Hugo Sach Electronic, Alemanha). A câmara fica em perfusão em todo o estudo com tampão Tyrodes oxigenado a 37°C a uma taxa de 10 ml/minuto.

Um eletrodo bipolar de estimulação (aço inoxidável revestido de teflon, diâmetro de 75 µm) é colocado numa extremidade do tecido. A estimulação é efetuada a 1 Hz usando pulsos retangulares no dobro do limiar (duração do estímulo 0,2 ms) libertados por um estimulador (Hugo Sachs, Tipo 215) através de uma unidade de isolamento (Universal Isolated Stimulator Unit tipo 263, Hugo Sachs, Alemanha).

Dois microelétrodos separados de irídio puro (World Precision Instruments, impedância da ponta 3,5-4,0 MΩ) são colocados numa linha ao longo do eixo geométrico longitudinal da preparação para registrar CV atrial. As distâncias do eletrodo de estimulação para o primeiro e segundo microelétrodos são de 1,5-2,0 mm e 3,0-4,0 mm, respetivamente. Cada microeletrodo é conectado a um pré-

amplificador do estágio principal (amplificação de 10x os sinais). Os pré-amplificadores são conectados a módulo amplificador de biopotencial que está conectado ao sistema de aquisição de dados por um PLUGSYS Hugo Sachs. Os sinais são filtrados a 1 kHz e amostrados a 10 kHz.

Depois de um período de equilíbrio de 30 minutos, a regulação a 1 Hz é iniciada. Durante o primeiro período de registro de 20 minutos (período da linha de base), a câmara fica sob perfusão com tampão Tyrodes oxigenado a 37°C, pH 7.3. Os compostos (por exemplo, compostos miméticos de lisina modificados dos ensinamentos presentes, AAP, AAP10 ou controlos) são adicionados, então, ao tampão de perfusão para um outro período de 20 minutos (período de pré-tratamento). Depois dos 20 minutos de pré-tratamento, a perfusão é mudada para um tampão Tyrodes não oxigenado isento de glicose a 37°C, pH 7,3 (com ou sem compostos de interesse) por 40 minutos (período de stress metabólico).

A mudança na velocidade de condução durante o stress metabólico é comparada a um grupo de controlos não tratados. Em preparações não tratadas, a condução diminui em 15-45% durante o período de 40 minutos de stress metabólico. Em algumas formas de realização, os compostos de acordo com os presentes ensinamentos podem prevenir a redução de condução induzida por stress metabólico durante o período de 40 minutos de maneira comparável aos compostos AAP, AAP10, HP5, ou um análogo funcional dos mesmos, isto é, os compostos podem preservar a condução normal durante um episódio de stress metabólico.

5. Ensaio hematológico

Os compostos dos presentes ensinamentos podem também ser testados para determinar seus efeitos na aceleração da

recuperação em seguida a um stress induzido por 5-fluorouracilo (5-FU) na proliferação da medula óssea. Ratos machos são tratados com 5-FU (75-100 nmol/kg i.p.) por 4 dias. Amostras de sangue são coletadas da ponta da cauda antes do tratamento com 5-FU (Dia 0) e 4, 8, 12, 16, 20, 24, 28 dias em seguida à primeira dose de 5-FU. As medidas de contagens sanguíneas periféricas (granulócitos, linfócitos, eritrócitos, trombócitos, reticulócitos) e hemoglobina no plasma são feitas. Após a identificação da janela com pancitopenia severa, o estudo é repetido durante o tratamento concomitante com um composto dos presentes ensinamentos.

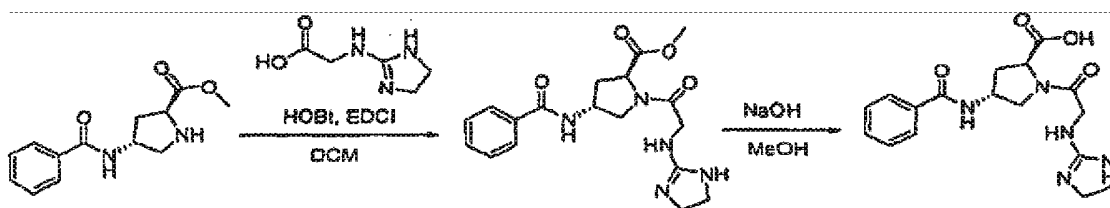
F. Preparação de compostos exemplares

Os seguintes exemplos não limitadores são apresentados meramente a fim de ilustrar os presentes ensinamentos. O perito na especialidade compreenderá que há equivalentes numerosos e variações não exemplificadas, mas ainda fazem parte dos presentes ensinamentos.

Os compostos miméticos de lisina dos presentes ensinamentos podem ser sintetizados por meio de síntese de fase sólida ou de fase de solução. Neste contexto, referência é feita, entre muitos outros, a Fields et al., "Principles and practice of solid-phase peptide synthesis", Synthetic Peptides (2002, 2^a edição).

O esquema 1 ilustra uma síntese exemplar de composto de ácido (2S, 4R)-4-benzamido-1-(2-(4,5-di-hidro-1H-imidazol-2-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico.

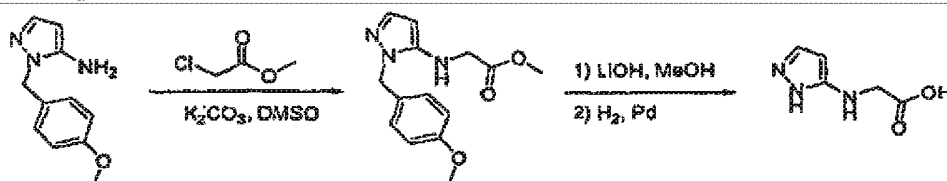
Esquema 1



Diferentes derivados de aminoácido N-substituídos podem ser usados para sintetizar outros compostos. Por exemplo, 2-cloro-1H-imidazol ou 4-bromo-1H-imidazol pode ser tratado com glicina em água (por exemplo, de acordo com o procedimento determinado em European Journal of Medicinal Chemistry (1989), 24 (6), 623-5) para formar ácido 2-(1H-imidazol-2-ilamino)acético ou ácido 2(1H-imidazol-4-ilamino)acético, respetivamente, que pode então ser usado para sintetizar ácido (2S,4R)-1-(2-(1H-imidazol-2-ilamino)acetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico ou ácido (2S,4R)-1(2-(1H-imidazol-4-ilamino)acetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico de uma maneira similar ao esquema 1. Os compostos tais como ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(piridin-2-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(pirimidin-4-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico e ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(pirimidin-2-ilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico podem de maneira similar ser sintetizados de ácido 2-(piridin-2-ilamino)acético, ácido 2-(pirimidin-4-ilamino)acético e ácido 2-(pirimidin-2-ilamino)acético, respetivamente.

Alternativamente, o derivado de glicina pode ser sintetizado de acordo com o esquema 2:

Esquema 2

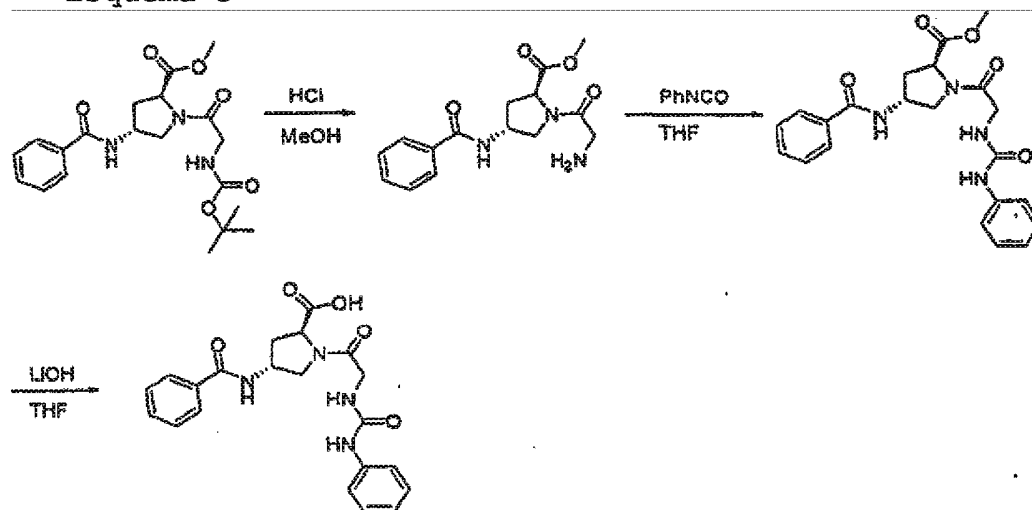


No exemplo acima, o ácido 2-(1H-pirazol-5-ilamino)acético produzido assim pode ser usado para sintetizar ácido (2S,4R)-1-(2-(1H-pirazol-5-ilamino)acetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico usando o método mostrado no esquema 1.

Outros compostos podem ser sintetizados de acordo com o esquema 1 utilizando os materiais de partida de ácido carboxílico apropriados. Por exemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(1H-imidazol-2-carbonil)pirrolidina-2-carboxílico, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(1H-pirazol-5-carbonil)pirrolidina-2-carboxílico ou ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(1H-imidazol-5-carbonil)pirrolidina-2-carboxílico pode ser sintetizado de acordo com o esquema 1 usando ácido 1H-imidazol-2-carboxílico, ácido de 1H-pirazol-5-carboxílico ou ácido 1H-imidazol-5-carboxílico, respetivamente.

O esquema 3 ilustra uma outra síntese exemplar de um composto. Neste exemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(3-fenilureído)acetil)pirrolidina-2-carboxílico, R^3 é $C(O)NR^6R^7$.

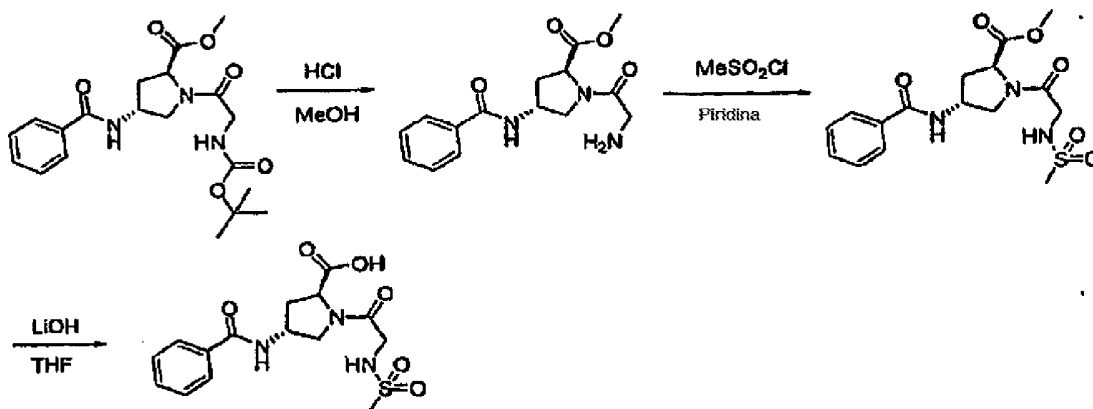
Esquema 3



Diferentes isocianatos (por exemplo, metilisocianato ou isopropilisocianato) podem ser utilizados na síntese do esquema 3 para produzir outras ureias (por exemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(3-metilureido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico ou ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(3-isopropilureido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico).

O esquema 4 ilustra uma síntese exemplar de ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(metilsulfonamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico.

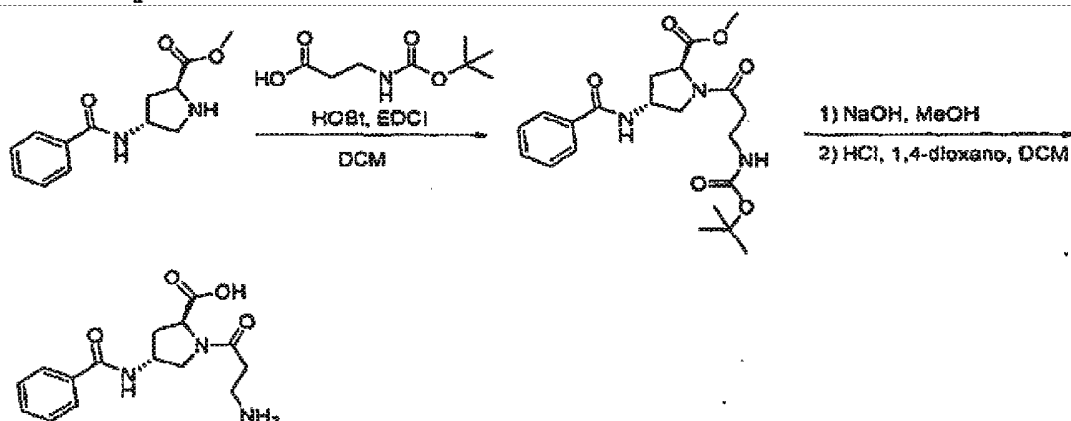
Esquema 4



Começando com outros cloretos de sulfonilo (por exemplo, cloreto do etanossulfonilo ou cloreto de propano-2-sulfonilo), sulfonamidas diferentes (por exemplo, ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(etilsulfonamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico ou ácido (2S,4R)-4-benzamido-1-(2-(1-metiletilsulfonamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico) podem ser preparadas usando o método mostrado no esquema 4.

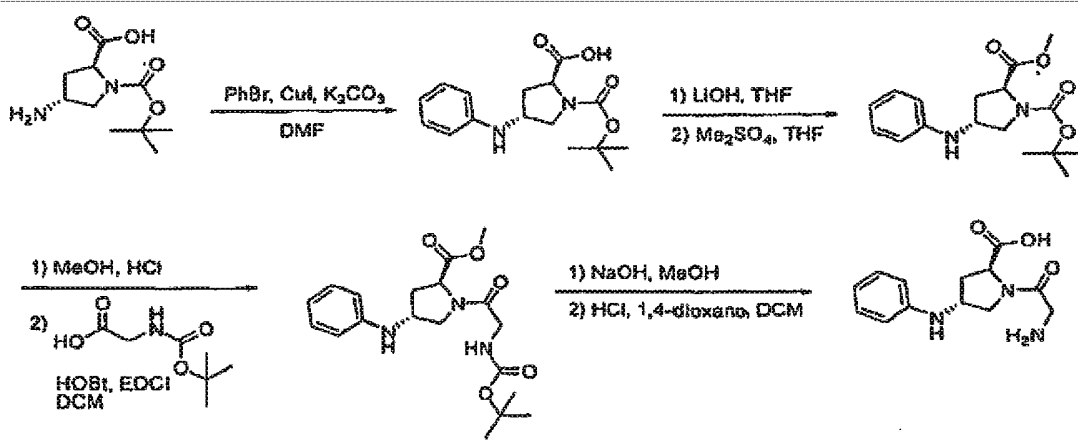
Outros compostos (por exemplo, ácido (2S,4R)-1-(3-aminopropanoil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico) podem ser sintetizados, por exemplo, de acordo com o Esquema 5.

Esquema 5



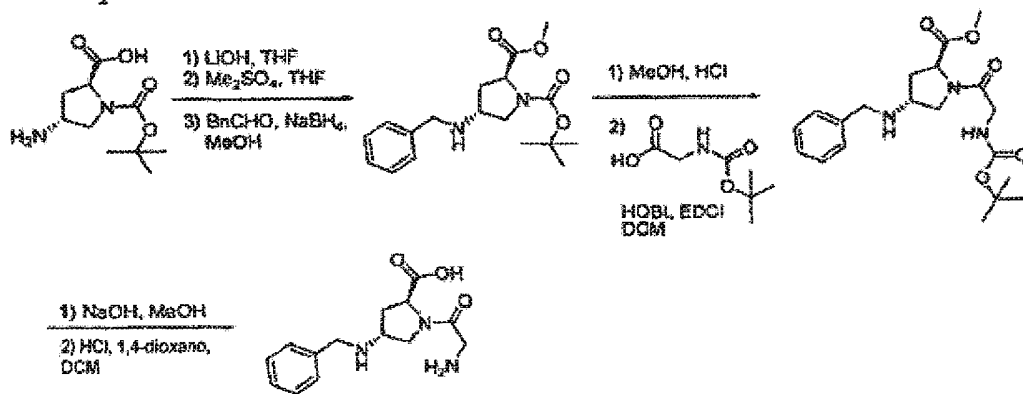
O Esquema 6 mostra uma síntese exemplar de composto, ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(fenilamino)pirrolidina-2-carboxílico.

Esquema 6



De maneira similar, o Esquema 7 ilustra um composto de síntese exemplar, ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(benzilamino)pirrolidina-2-carboxílico.

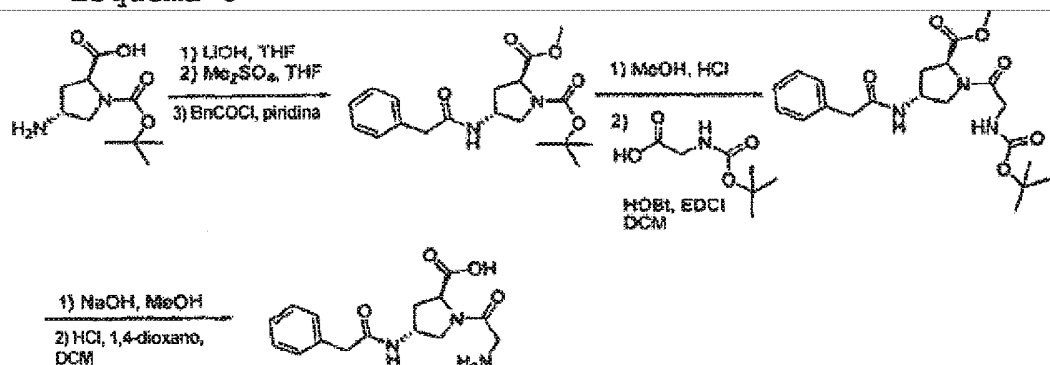
Esquema 7



Outros compostos podem ser preparados usando os materiais de partida apropriados de acordo com os métodos dos Esquemas 6 ou 7.

O Esquema 8 mostra uma síntese exemplar de composto, ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(2-fenilacetamido)pirrolidina-2-carboxílico.

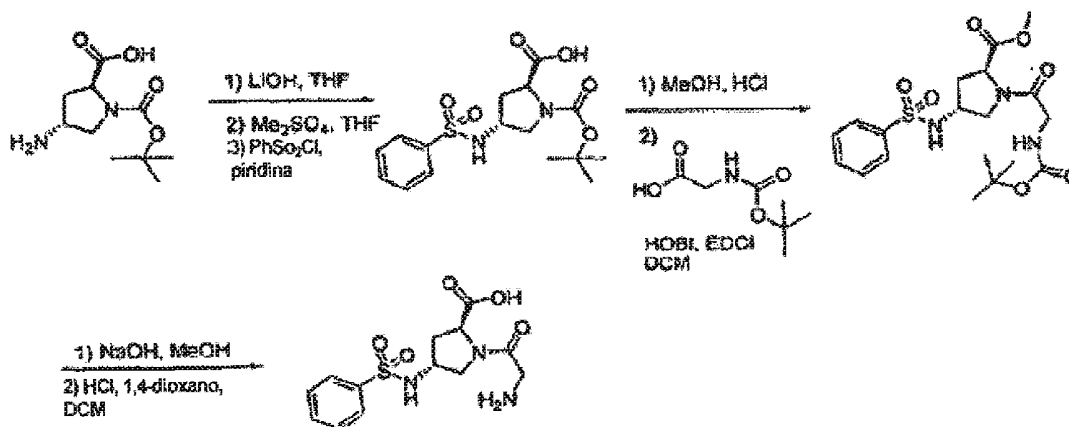
Esquema 8



Outros compostos podem ser preparados usando os materiais de partida apropriados de acordo com o método do Esquema 8.

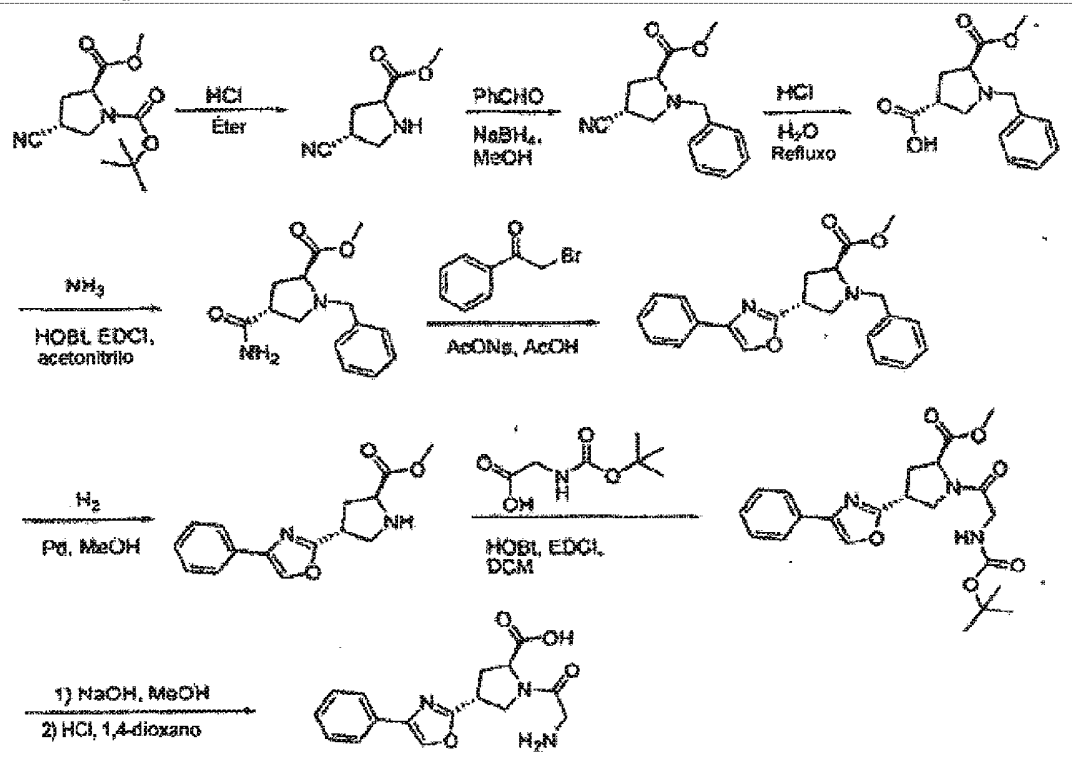
Outros compostos podem ser sintetizados, por exemplo, de acordo com o Esquema 9 que ilustra a síntese de ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(fenilsulfonamido)pirrolidina-2-carboxílico.

Esquema 9



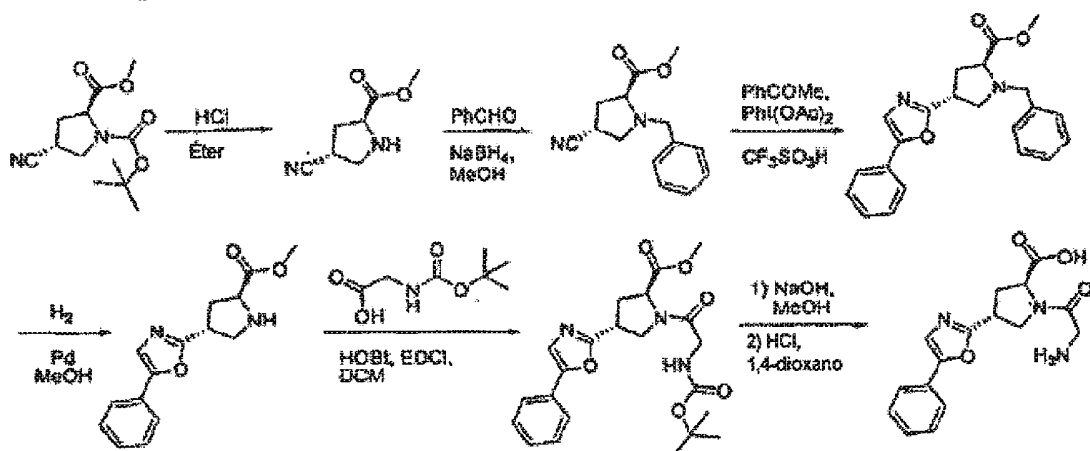
O Esquema 10 mostra uma síntese exemplar de ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(4-feniloxazol-2-il)pirrolidina-2-carboxílico (veja-se, por exemplo, Tetrahedron: Asymmetry, 14 (20), 3141-3152; 2003).

Esquema 10



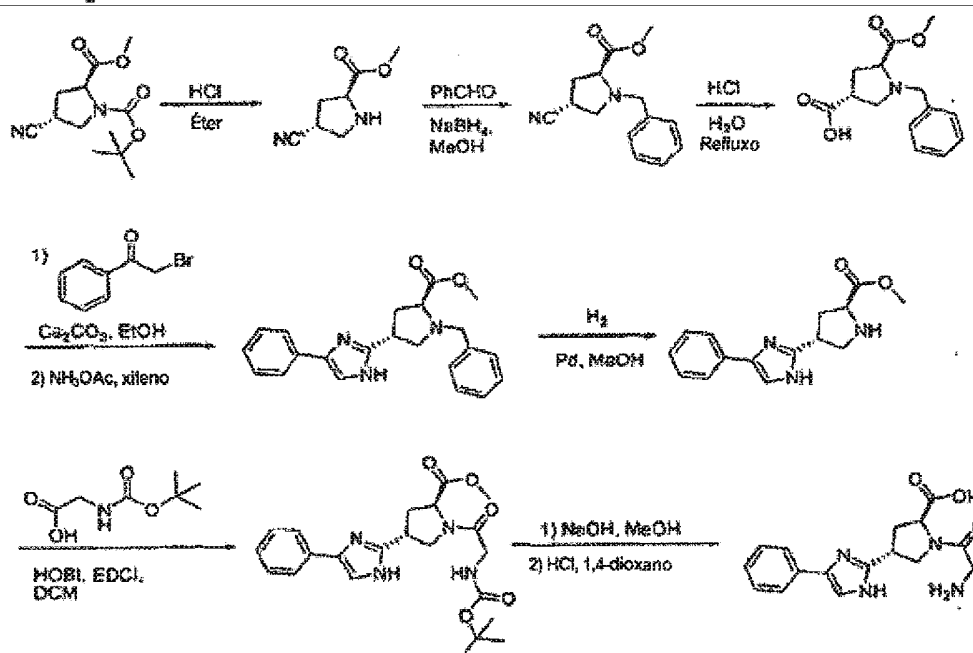
O Esquema 11 ilustra a síntese de um outro composto ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(5-feniloxazol-2il)pirrolidina-2-carboxílico (veja-se, por exemplo, Journal of Heterocyclic Chemistry (1998), 35(6), 1533-1534).

Esquema 11



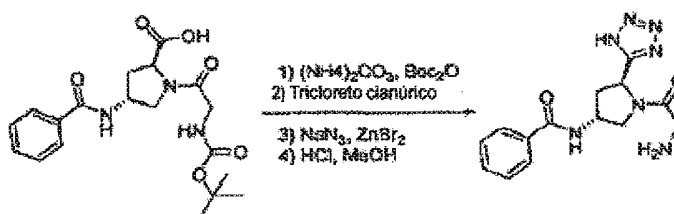
A síntese de ainda outro composto ácido (2S,4R)-1-(2-aminoacetil)-4-(4-fenil-1H-imidazol-2-il)pirrolidina-2-carboxílico é mostrada no Esquema 12 (veja-se, por exemplo, Tetrahedron: Asymmetry, 14(20), 3141-3152; 2003; Journal of Medicinal Chemistry, 44(18), 2990-3000; 2001).

Esquema 12



O Esquema 13 ilustra uma síntese exemplar de um composto N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetil)-5-(1H-tetrazol-5-il)pirrolidin-3-il)benzamida.

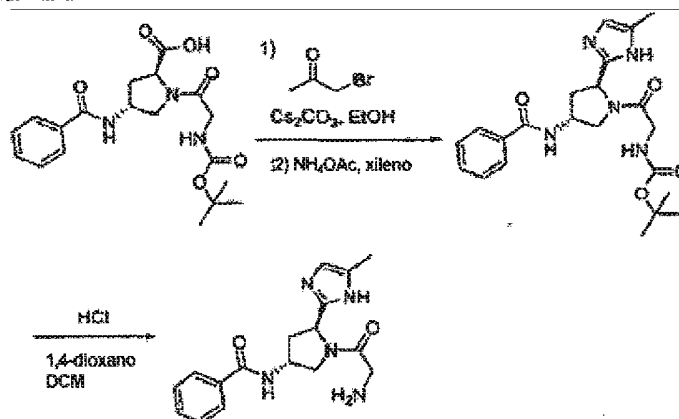
Esquema 13



O Esquema 14 mostra um outro método pelo qual certos compostos podem ser sintetizados (veja-se, por exemplo,

Journal of Medicinal Chemistry, 44(18), 2990- 3000; 2001).

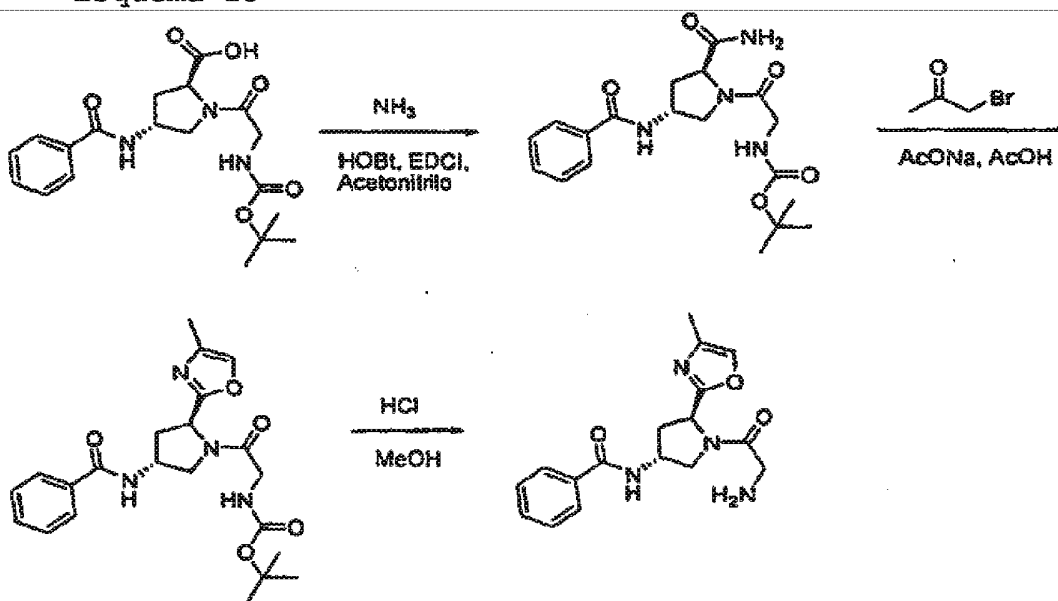
Esquema 14



Além da N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetyl)-5-(5-metil-1H-imidazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida mostrada no Esquema 14, os compostos que têm bioisósteros diferentes do ácido carboxílico podem ser sintetizados de acordo com este método usando reagentes diferentes de bromocarbonilo (por exemplo, N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetyl)-5-(1 H-imidazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida ou N-((3R,5S)-1-(2-aminoacetyl)-5-(5-isopropil-1 H-imidazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida).

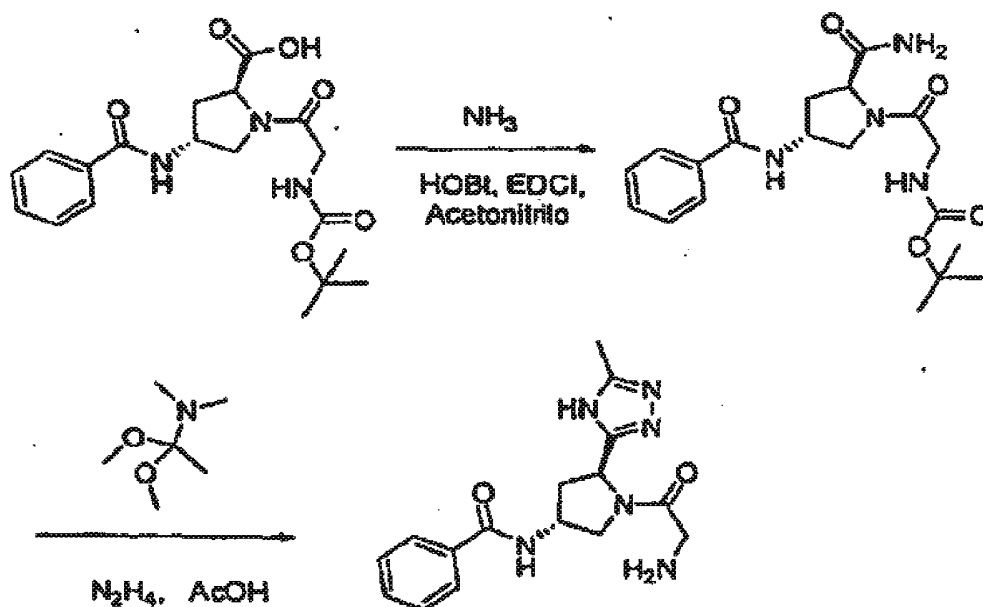
Os Esquemas 15-17 ilustram outros métodos exemplares para sintetizar certos.

Esquema 15



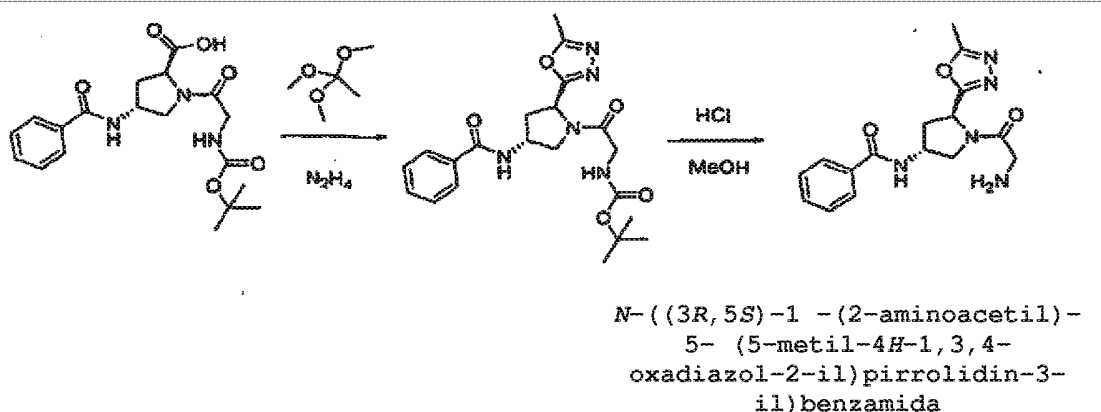
N-((3*R*,5*S*)-1-(2-aminoacetyl)-5-(4-metiloxazol-2-il)pirrolidin-3-il)benzamida

Esquema 16



N-((3*R*,5*S*)-1-(2-aminoacetyl)-5-(5-metil-4*H*-1,2,4-triazol-3-il)pirrolidin-3-il)benzamida

Esquema 17



Além dos compostos mostrados nos Esquemas 15-17, os compostos que têm bioisósteros carboxílicos diferentes podem ser sintetizados de acordo com estes métodos por meio da variação dos reagentes. Por exemplo, diferentes reagentes de brometo podem ser usados no Esquema 15 (por exemplo, para produzir $N-((3R,5S)-1-(2\text{-aminoacetyl})-5-(\text{oxazol-}2\text{-il})\text{pirrolidin-}3\text{-il})\text{benzamida}$); dimetilaminocetais diferentes podem ser usados no Esquema 16 (por exemplo, para produzir $N-((3R,5S)-1-(2\text{-aminoacetyl})-5-(4H\text{-}1,2,4\text{-triazol-}3\text{-il})\text{pirrolidin-}3\text{-il})\text{benzamida}$ ou $N-((3R,5S)-1-(2\text{-aminoacetyl})-5-(5\text{-isopropil-}4H\text{-}1,2,4\text{-triazol-}3\text{-il})\text{pirrolidin-}3\text{-il})\text{benzamida}$); e ésteres orto diferentes podem ser usados no Esquema 17 (por exemplo, para produzir $N-((3R,5S)-1-(2\text{-aminoacetyl})-5-(1,3,4\text{-oxadiazol-}2\text{-il})\text{pirrolidin-}3\text{-il})\text{benzamida}$).

1. Síntese geral de péptido

Os compostos dos presentes ensinamentos podem ser preparados usando o método de síntese descrito, por exemplo, no documento WO 98/11125 (a divulgação inteira do qual é incorporada para referência no presente documento). Os referidos métodos de síntese resultarão num péptido primário ou produto similar a péptido que tem um contra-ção

de trifluoroacetato e que pode ser apropriado para a preparação de um medicamento. Em alguns casos, entretanto, pode ser vantajoso executar uma permuta de contra-íão de trifluoroacetato para um anião farmaceuticamente aceitável ou preferido (por exemplo, acetato), por exemplo, por cromatografia de permuta iônica. Alternativamente, o péptido primário ou produto similar a péptido podem ser repetidamente liofilizados e dissolvidos em ácido clorídrico diluído para obter o cloridrato purificado.

Aparelho e estratégia sintética

Ao usar a metodologia de fase contínua, os péptidos modificados foram sintetizados em lotes num vaso de polietileno equipado com um filtro de polipropileno para filtragem usando 9-fluorenilmetiloxycarbonilo (Fmoc) e terc-butiloxycarbonilo (Boc) ou grupos de proteção de outra maneira apropriados para as funcionalidades N-amino e cadeia lateral tais como Alil, Alloc, Dde, Z etc. Ao usar técnicas de fase da solução, os péptidos modificados foram sintetizados usando equipamento padrão durante todas as sínteses.

Solventes

O solvente DMF (N,N-dimetilformamida, Riedel de-Häen, Alemanha) foi purificado passando através de uma coluna empacotada com uma resina de forte permuta de catiões (ácido forte Lewatit S 100 MB/H, Bayer AG Leverkusen, Alemanha) e analisado quanto a aminas livres antes do utilização por adição de 3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3-benzotriazina (Dhbt-OH) dando surgimento a uma cor amarela (anião de Dhbt-O) se as aminas livres estiverem presentes. O solvente DCM (diclorometano, grau analítico, Riedel de-Häen, Alemanha) foi usado diretamente sem purificação. Acetonitrilo (grau HPLC, Lab-Scan, Dublin,

Irlanda) foi usado diretamente sem purificação.

Aminoácidos

Aminoácidos protegidos por Fmoc e Boc foram comprados de Advanced ChemTech (ACT), Bachem e de NeoMPS em formas protegidas de cadeia lateral adequadas.

Derivados de ácido benzoico

Derivados de ácido benzoico foram comprados de Aldrich e usados sem purificação adicional.

Reagentes de acoplamento

Reagente de acoplamento di-isopropilcarbodiimida (DIC) foi comprado de (Riedel de-Häen, Alemanha).

Suportes Sólidos

Os péptidos foram sintetizados em TentaGel (por exemplo, SRam) e Poliestireno (por exemplo, resina PAM) de Advanced ChemTech e Rapp.

Catalisadores e outros Reagentes

Diisopropiletilamina (DIEA) foi comprada de Aldrich, Alemanha, e etilenodiamina de Fluka, hidrazina, piperidina e piridina de Riedel de-Häen, Frankfurt, Alemanha. 4-(N,N-dimetilamino)piridina (DMAP) foi comprada de Fluka, Suíça e usada como um catalisador em reações de acoplamento envolvendo anidridos simétricos. Etanditíol e Tioanisól foram comprados de Riedel de-Häen, Frankfurt, Alemanha. 3,4-di-hidro-3-hidroxi-4-oxo-1,2,3- benzotriazina (Dhbt-OH), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (HOAt) foram obtidos de

Fluka, Suíça.

Procedimentos de acoplamento

O primeiro aminoácido pode ser acoplado como um anidrido simétrico em DMF gerado do aminoácido N- α -protegido apropriado e os aminoácidos subsequentes podem ser acoplados como ésteres de HOBT ou HOAt gerados *in situ* feitos de aminoácidos N- α -protegidos apropriados e HOBT ou HOAt por meio de DIC em DMF. As acilações foram verificadas pelo teste de ninhidrina executado a 80°C a fim de prevenir a desproteção de Fmoc durante o teste (B.D. Larsen, A. Holm, Int. J. Pept. Protein Res., 43, 1- 9 (1994)).

Desproteção do Grupo de Proteção (Fmoc e Fm)

A desproteção do grupo Fmoc e Fm foi executada pelo tratamento com piperidina 20% em DMF (1x5 e 1x10 minuto), seguido de lavagem com DMF (5 x 15 ml, 5 minuto cada) até que nenhuma cor amarela pudesse ser detetada após adição de Dhbt-OH ao DMF drenado.

Desproteção do Grupo de Proteção (Boc e tBu)

A desproteção do grupo Boc e tBu foi executada pelo tratamento com o TFA 50% em DCM v/v (2 x 2 minuto, 1 x 30 minuto) seguido de lavagem com DCM (6x2 minuto) e, então, com tratamento de DMF (2x2 minuto) com a DIEA 5% em DMF v/v (3 x 2 minuto) e seguido finalmente de lavagem com DMF (6 x 2 minuto).

Desproteção de Alloc e Alil

Uma solução de 3 eq. Pd(PPh₃)₄ dissolvidos em 15-20 ml CHCl₃, AcOH, NMM (37:2:1) foi adicionada à resina de

péptido. O tratamento foi continuado por três horas em temperatura ambiente acompanhado de borbulhamento de uma corrente de N₂ através da mistura.

Acoplamento de Ésteres de Hobt

3 eq. De aminoácido N- α -amino protegido foram dissolvidos em DMF juntamente com 3 eq. HOBT e 3 eq. DIC e, então, adicionados à resina.

Anidrido Simétrico Preformado

Seis eq. de aminoácido N- α -amino protegido foram dissolvidos em DCM e arrefecidos a 0°C. DIC (3 eq.) foram adicionados e a reação continuou por 10 minutos. O solvente foi removido a vácuo e o restante dissolvido em DMF. A solução foi adicionada imediatamente à resina seguida por 0,1 eq. de DMAP.

Clivagem do Composto da resina usando TFMSA

A resina de Peptidilo foi tratada com ácido trifluoroacético 90% (TFA, Riedel de-Häen, Frankfurt, Alemanha) ácido trifluorometanossulfônico 4% (TFMSA, Aldrich) etanditiol 2%, tioanisol 4% v/v a t. a. por 30-60 minutos. A resina filtrada foi lavada com TFA e os filtrados e os lavados evaporados sob pressão reduzida. O resíduo foi lavado com éter e liofilizado do ácido trifluoroacético-água. O produto liofilizado bruto foi analisado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e identificado por espectrometria de massa de ionização por eletrospray (ESMS).

Clivagem do Composto da Resina usando TFA

A resina de Peptidilo foi tratada com ácido trifluoroacético (TFA, Riedel de-Häen, Frankfurt, Alemanha) - água 95% v/v ou com TFA 95% e etanditiol 5% v/v a temperatura ambiente por 2 horas. A resina filtrada foi lavada com TFA-água 95% e os filtrados e os lavados evaporados sob pressão reduzida. O resíduo foi lavado com éter e liofilizado do ácido acético- água. O produto liofilizado bruto foi analisado por cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC) e identificado por espectrometria de massa de ionização por eletrospray (ESMS).

Condições Preparativas de HPLC

A cromatografia preparativa foi realizada usando uma VISION Workstation (PerSeptive Biosystem) equipada com um coletor/autoamostrador de fração automático AFC2000, o software VISION-3 foi usado para controlo de instrumento e aquisição de dados.

Coluna

Kromasilo (EKA Chemicals) KR100-10-C8 100A, C-8, 10 pm; CER 2230, 250 x 50,8 mm ou uma VYDAC 218TP101550, 300A, C-18, 10- 15 pm, 250 x 50 mm. O sistema de tampão usado incluiu A: 0,1% de TFA em MQV; B: 0,085% de TFA, 10% de MQV, 90% de MeCN. As taxas de fluxo foram de 35-40 ml/min e a temperatura da coluna foi de 25°C. Detecção de UV foi executada a 215 nm e 280 nm. Gradientes apropriados foram aperfeiçoados para péptidos individuais.

Condições analíticas de HPLC

A análise de gradiente de HPLC foi feita usando um sistema de HPLC Hewlett Packard HP 1100 consistindo numa

Bomba Quaternária HP 1100, um Autoamostrador HP 1100 um Termostato de Coluna HP 1100 e Detetor de Comprimento de Onda Múltiplo HP 1100 Hewlett Packard Chemstation para o software LC (rev. A.06.01) foi usado para controlo de instrumento e aquisição de dados. Para HPLC analítica, colunas diferentes foram usadas como apropriado, tal como VYDAC 238TP5415, C-18, 5 μ m, 300A ou uma Júpiter, Phenomenex 00F-4053-E0; 5 μ m C-18, 300A 150 x 4,6 mm e outras. O sistema de tampão incluiu A: 0,1% de TFA em MQV; B: 0,085% de TFA, 10% de MQV, 90% de MeCN. As taxas de fluxo foram de 1 ml/minuto A temperatura preferida da coluna foi de 40°C. A deteção UV foi executada em 215 nm. Como acima, os gradientes apropriados foram aperfeiçoados para os péptidos individuais.

Espectroscopia de Massa

Os péptidos foram dissolvidos em metanol super gradiente (Labscan, Dublin, Irlanda), água Milli-Q (Millipore, Bedford, MA) e ácido fórmico (Merck, Damstadt, Alemanha) (50:50:0,1 v/v/v) para dar concentrações entre 1 e 10 mg/ml. As soluções de péptido (20 ml) foram analisadas no modo de polaridade positiva por ESI-TOF-MS usando um espectrómetro de massa LCT (Micromass, Manchester, Reino Unido) precisão de $\pm 0,1$ m/z.

Síntese de fase sólida

Em todas as sínteses, a resina seca foi colocada num vaso de polietileno equipado com um filtro de polipropileno para filtragem. A resina foi inchada em DMF. O primeiro aminoácido foi acoplado ou como um anidrido simétrico preformado ou como um éster pré-ativado de HOBt como descrito acima. O seguinte aminoácido de acordo com a sequência foi acoplado como um éster preformado de HObt

como descrito acima. Todos os acoplamentos foram continuados por no mínimo 2 horas, a menos que especificado de outra maneira. O acoplamento do derivado de ácido benzoico à funcionalidade amino da cadeia lateral no aminoácido mimético de lisina foi em todos os casos executado usando um éster de HOBT preformado. O produto final de péptido foi clivado do suporte sólido e analisado por HPLC e MS como descrito acima.

Em todos os casos o derivado de ácido benzoico é funcionalizado como um ácido carboxílico e foi acoplado como um éster de HOBT gerado *in situ* por meio de DIC em THF.

Todos os acoplamentos foram continuados por no mínimo 2 horas. As acilações foram verificadas pelo teste de ninhidrina executado a 80°C como descrito anteriormente. Após a síntese terminada a resina de péptido foi lavada com DMF (3 x 15 ml, 1 minuto cada uma), DCM (3x15 ml, 1 minuto cada uma), éter dietílico (3 x 15 ml, 1 minuto cada uma) e seca a vácuo. O péptido foi clivado, então, da resina como descrito acima e seco por congelamento. Após a purificação usando a HPLC preparativa como descrito acima, o produto de péptido foi colhido e a identidade do péptido foi confirmada por ES-MS.

Síntese de fase de Solução Exemplar

Um aminoácido protegido apropriado ou um hidroxil ou tiohidroxil ácido acético com um ácido carboxílico não protegido (1 eq.) é dissolvido em DMF juntamente com DIC (1 eq.) e HOBT (1 eq.). Após 1 hora de pré-ativação um bloco de construção de mimético de lisina (LM) é adicionado com um grupo amino não protegido (1,1 eq.) juntamente com o TEA (1,3 eq.) e a mistura é agitada durante toda a noite à

temperatura ambiente.

A mistura de reação é evaporada até a secura e o resíduo é dissolvido em acetato de etilo. A fase de acetato de etilo é extraída com (1) uma solução aquosa de ácido clorídrico (0,1 M) e (2) uma solução aquosa de hidróxido de sódio (0,1 M) (3) água a fim remover o excesso de material de partida. A fase orgânica é tratada com o MgSO_4 (dessecado) filtrado e evaporado até a secura.

O grupo amino protegido restante do LM é desprotegido usando TFA/DCM se o grupo de proteção é baseado em tBu, ciclohexano Pd se baseado em benzilo, piperidina/DCM se baseado em fluorenilo, hidrazina se baseado em Dde. Após terminar a reação de desproteção (1-2 horas) a mistura de reação é evaporada até a secura. O resíduo é lavado com éter dietílico e dissolvido em DMF juntamente com 1,3 eq. e adicionado finalmente a uma solução de um ácido benzoico substituído (1 eq.) que foi pré-ativado pelo tratamento com DIC (1eq.) e HOBT (1eq.) em DMF. A reação de acoplamento é continuada durante toda a noite.

A mistura de reação é evaporada até a secura e o resíduo é dissolvido em acetato de etilo. A fase de acetato de etilo é extraída com (1) uma solução aquosa de ácido clorídrico (0,1 M) e (2) uma solução aquosa de hidróxido de sódio (0,1 M) (3) água a fim remover o excesso de material de partida. A fase orgânica é tratada com MgSO_4 (dessecado) filtrado e evaporado até a secura.

Os grupos de proteção restantes são desprotegidos usando TFA/DCM se os grupos de proteção são baseados em tBu, Ciclohexeno de Pd se baseados em Benzilo, Piperidina/DCM se baseados em Fluorenilo, hidrazina se baseados em Dde. Após terminar a reação de desproteção (1-2

horas) a mistura de reação é evaporada até a secura. O resíduo é lavado com éter dietílico e dissolvido em TFA/Água e purificado usando HPLC preparativa. Após purificação usando HPLC preparativa como descrito acima, o produto de péptido foi colhido e a identidade do péptido foi confirmada por ES-MS.

2. Síntese de Fase Sólida do Composto 2: ácido (2S4R) 1-(2-amino-acetil)-4- benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico

Resina PAM (Advanced Chemtech) foi inchada em DMF, lavada com Trietilo amina 5% (TEA) em DMF e lavada com DMF até que nenhuma cor amarela pudesse ser detetada após adicionar Dhbt-OH ao DMF drenado. (2S4R) Boc-4Amp(Fmoc)-OH foi acoplado como anidrido simétrico como se segue.

3 eq. (2S4R) Boc-4Amp (Fmoc)-OH foi dissolvido em DCM e arrefecido até 0°C. DIC (1,5 eq.) foi adicionado e a reação foi continuada por 10 minutos. O solvente foi removido a vácuo e o resíduo dissolvido em DMF. A solução foi adicionada imediatamente à resina seguida por 0,1 eq. de DMAP. O acoplamento foi continuado durante toda a noite. O reagente de acoplamento em excesso foi removido por lavagem com DMF. A desproteção do grupo Fmoc foi executada pelo tratamento com piperidina 20% em DMF (1x5 e 1x10 minuto), seguido de lavagem com DMF até que nenhuma cor amarela pudesse ser detetada após adição de Dhbt-OH ao DMF drenado.

O acoplamento de ácido benzoico foi realizado como se segue. 3 eq. de ácido benzoico foram dissolvidos em DMF juntamente com 3 eq. HOBT e 3 eq. DIC e adicionados, então, à resina. O acoplamento foi continuado durante toda a noite. O reagente de acoplamento em excesso foi removido por lavagem com DMF. Antes da desproteção do grupo Boc a

resina foi tratada com DCM. A desproteção do grupo Boc foi executada pelo tratamento com 50% de TFA em DCM v/v (2 x 2minuto, 1 x 30 minuto) seguido pela lavagem com DCM e, então, com DMF e, então, tratamento com 5% DIEA em DMF v/v e seguido finalmente de lavagem com DMF.

O acoplamento de Boc-Gly-OH foi realizado como se segue. 3 eq. Boc-Gly-OH foram dissolvidos em DMF juntamente com 3 eq. HOBt e 3 eq. DIC e adicionados, então, à resina. O acoplamento foi continuado por 2 horas. O reagente de acoplamento em excesso foi removido por lavagem com DMF. O acoplamento foi repetido e continuado durante toda a noite. Antes da clivagem do péptido do suporte sólido a resina de péptido foi lavada com DCM e, então, com éter e seca finalmente sob vácuo.

A clivagem do dipéptido da Resina PAM foi realizada como se segue. A resina de péptido foi tratada com ácido trifluoroacético (TFA, Riedel de-Häen) e após 10 minuto um volume correspondente a 10% do volume total de TFA de ácido trifluorometanossulfónico (TFMSA, Aldrich) foi adicionado a temperatura ambiente e a reação foi continuada por 2 horas. As resinas filtradas foram lavadas com TFA. A matéria-prima foi precipitada da solução de TFA adicionando dietiléter.

A matéria-prima foi colhida como um óleo marrom. A solução de éter foi ainda extraída com água e a fase de água foi evaporada. A quantidade total de matéria-prima foi purificada usando HPLC prep. (coluna Vydac C18): Tampão A: 0,1% de TFA em Água; Tampão B: 90% AcCN; 0,1% de TFA; 9,9% Água. Fluxo: 35 ml/minuto Gradiente: 0 - 47 minuto 100% A a 75% A (linear). Pureza HPLC: 99%. MS: calculado M + H = 291,12; encontrado M + H = 291,7.

3. Síntese de Fase de Solução do Composto 2

A uma solução de NaHCO_3 (58,64 g, 0,698 mol) em água (625 ml) A/-BOC-*trans*-4-amino-L-prolina metilo éster cloridrato (50 g, 0,1745 mol, CNH Technologies, 98%) foi adicionado em porções, seguidas por EtOAc (500 ml). A mistura foi arrefecida até 0°C. Uma solução de cloreto de benzoilo (20,26 ml, 0,1745 mol) em EtOAc (100 ml) foi adicionada durante 25 minuto a 0°C. A mistura de reação foi agitada a 0°C por 1 hora. As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com 2x200 ml de EtOAc. A fração orgânica combinada foi lavada com 200 ml de HCl 1N, 100 ml de solução de NaHCO_3 saturada, 100 ml de salmoura, seca sobre MgSO_4 e concentrada para dar 60,67 g de (2S,4R)-1-*terc*-butil-2-metil-4-benzamidopirrolidina-1,2-dicarboxilato como um óleo pesado (rendimento 99,8%; rendimento 94% ajustado para EtOAc residual). ^1H RMN (CDCl_3 , δ , ppm; para dois conformadores): 7,78-7,7 (m, 2 H), 7,56-7,4 (m, 3 H), 6,25-6,1 (m, 1 H), 4,8-4,67 (m, 1 H), 4,51-4,41 (m, 0,4 H), 4,34 (dd, $J = 7, 7$ Hz, 0,6 H), 3,97-3,84 (m, 1 H), 3,76 (s, 3H), 3,52 (dd, $J = 11, 4$ Hz, 0,6 H), 3,39 (dd, $J = 11, 4$ Hz, 0,4 H), 2,47-2,21 (m 2 H), 1,46 (s, 3,6 H), 1,43 (s, 5,4 H), MS (m/z, ESI positivo, para M+Na): 371.

(2S,4R)-1-*terc*-Butil-2-metil-4-benzamidopirrolidina-1,2-dicarboxilato (60,19 g, contem 5,6% EtOAc; 0,1631 mol) foi dissolvido em Et_2O (100 ml) e o solvente foi evaporado sob vácuo para remover EtOAc residual. O óleo residual foi dissolvido em Et_2O (100 ml). Solução de HCl 2N em Et_2O (700 ml) foi adicionada (exoterma suave; precipitação começou após aproximadamente 5 minutos). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 21 h. Nesse ponto, 200 ml de solução de HCl 2N em Et_2O foram adicionados e a mistura foi agitada por 24 h adicionais. O precipitado foi filtrado, lavado com 500 ml de éter dietílico e seco em vácuo a

temperatura ambiente por 24 h para dar 46,03 g de cloridrato de 4-benzamidopirrolidina-2-carboxilato de (2S, 4R)-metilo (rendimento de 99%). ^1H RMN (CD_3OD , δ , ppm): 7,91-7,84 (m, 2 H) 7,6-7,44 (m, 3H), 4,78 (t, $J = 8,5$ Hz, 1 H), 4,69- 4,59 (m, 1 H), 3,77 (dd, $J = 12, 6,6$ Hz, 1 H), 3,52 (dd, $J = 12, 5$ Hz, 1 H), 2,67-2,5 (M, 2 H), MS (m/z, ESI positivo, para $M + H$): 249.

A uma solução de BOC-Gly-OH (28,13 g, 0,1606 mol) e 1-hidroxibenzotriazol (0,1686 mol, 25,64 g; contém 11,12% em peso de H_2O) em THF (1,3 L) foi adicionado cloridrato de N-(3-dimetilaminopropil)- N'etilcarbodiimida (0,1686 mol, 32,328 g) (frasco A). A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 4 h, a seguir a agitação foi paralisada e o resíduo oleoso foi deixado sedimentar. Num frasco separado (frasco B), NaOH (0,1606 mol; 32 ml de solução 5N) foi adicionado a uma suspensão de cloridrato de 4-benzamidopirrolidina-2-carboxilato de (2S, 4R)-metilo (0,1606 mol, 45,73 g) em THF (0,52 L) durante 15 minuto A mistura foi agitada a temperatura ambiente por 10 minuto, durante cujo tempo a maioria dos sólidos se dissolveu. A solução de éster de HOBt preparada no frasco A foi adicionada ao frasco B a temperatura ambiente durante 15 minuto, deixando para trás o resíduo oleoso. O resíduo no Frasco A foi lavado com 250 ml de THF e a solução de THF foi decantada do óleo pesado e adicionada à mistura no Frasco B. A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente por 40 minuto Água (500 ml) foi adicionada e a mistura foi concentrada sob vácuo para remover THF (~550 ml de volume residual). EtOAc (500 ml) foi adicionado, seguido por salmoura (300 ml). As fases foram separadas e a fase aquosa foi extraída com 2x300 ml de EtOAc. A fração orgânica combinada foi lavada com 2x250 ml de HCl 1N, 2x250 ml de solução de NaHCO_3 sat. e 150 ml de salmoura, então, seca sobre MgSO_4 e concentrada para dar 48,31 g de (2S, 4R)

metil-4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxilato como um sólido espumoso (rendimento de 74%). ^1H RMN (CDCl_3 , δ , ppm; para dois conformadores): 7,81-7,72 (m, 2 H), 7,57-7,39 (m, 3 H), 6,41 (d, $J = 6$ Hz, 0,8 H), 6,25 (d, $J = 6$ Hz, 0,2 H), 5,32 (Br, s, 1 H), 4,88-4,74 (m, 1 H), 4,65 (t, $J = 7$ Hz, 1 H), 4,11-3,86 (m, 2 H) 1 3,83-3,78 (m, 1 H), 3,76 (s, 3 H), 3,69-3,56 (M, 1 H), 2,65-2,3 (m, 2 H) 1 1,43 (s, 9 H), MS (m/z, ESI positivo, para $M + \text{Na}$): 428.

A uma solução de (2S, 4R) metil-4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonil-amino)acetil)pirrolidina-2-carboxilato (23,33 g, 0,0575 mol) em metanol (450 ml) foi adicionado NaOH (0,2875 mol, 144 ml de solução aquosa 2N) a -1 a 1°C durante 15 minuto A mistura foi agitada a -5 a -1°C por 2,5 h. HCl (0,2875 mol, 144 ml de solução aquosa 2N) foi adicionado a -3 a 1°C durante 25 minuto MeOH foi destilado sob vácuo, então, 500 ml de EtOAc foram adicionados. A fase aquosa foi saturada com NaCl e as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com 2x250 ml EtOAc e a solução combinada de EtOAc foi seca sobre MgSO_4 e concentrada para dar 22,54 g de ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico como um sólido espumoso branco (contém 6,6% em peso EtOAc; rendimento de 94% ajustado para EtOAc residual). ^1H RMN (CD_3OD , δ , ppm): 7,87-7,79 (m, 2 H), 7,58-7,42 (m, 3 H), 4,81-4,7 (m 1 H), 4,69-4,56 (m, 1 H), 4,05-3,72 (m, 3 H), 3,67-3,49 (m, 1 H), 2,64-2,28 (m, 2 H), 1,43 (s, 9 H), MS (m/z, ESI positivo) para $M + \text{H}$: 392; para $M + \text{Na}$: 414.

Ácido (2S, 4R) 4-Benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico (21,97 g; contém 6,6% em peso EtOAc; 0,0524 mol, ajustados para EtOAc residual) foi dissolvido em dioxano (100 ml). O

solvente foi evaporado sob vácuo para remover EtOAc residual. O resíduo foi dissolvido em dioxano anidro (200 ml) e HCl (100 ml de solução recentemente preparada ~3,6N em dioxano) foi adicionado a 10 - 12°C. A solução foi deixada aquecer até a temperatura ambiente (a precipitação começou após aproximadamente 2 minuto). A mistura de reação foi agitada a temperatura ambiente por 21 h, em cujo tempo 30 ml de solução de HCl ~3,6N foram adicionados e a mistura foi agitada por 5,5 h adicionais. Sólidos precipitados foram filtrados usando pressão de N₂, lavados com 4x25 ml de dioxano e secados sob vácuo a temperatura ambiente por 24 h para dar 18,7 g de produto bruto como sólido branco. O produto bruto foi dissolvido em *i*-PrOH (104 ml) e 210 ml de éter dietílico foram adicionados por 1 h (precipitado formado imediatamente mediante cada adição de éter). A mistura foi agitada por 1 h, filtrada usando pressão de N₂, lavada com 2x50 ml de solução Et₂O-*i*-PrOH 3:1 e seca sob o vácuo a temperatura ambiente por 24 h e a 40°C por 48 h para dar 15,7 g de cloridrato de ácido (2S, 4R)-1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico. ¹H RMN (DMSO-d₆, δ, ppm, para dois conformadores): 8,77 (d, J = 7 Hz, 0,8 H), 8,71 (d, J = 7 Hz, 0,2 H), 8,68-7,95 (l, 2 H), 7,92-7,83 (m, 2 H), 7,59-7,43 (m, 3 H), 4,87-4,79 (m, 0,2 H), 4,68-4,54 (m, 0,8 H), 4,54-4,44 (m, 1 H), 4,0 - 3,47 (m, 4 H), 2,47-2,12 (m, 2 H). HRMS calculado para C₁₄H₁₈N₃O₄ (M + H): 292,1297, encontrado: 292,1294.

4. Síntese dos compostos 64-68 e 70-78

Ácido (2S, 4R)-4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico (0,05 g, 0,1 mmol), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (Aldrich, 0,021 g, 0,15 mmol, 1,2 equivalentes) e cloridrato de 1-(3,3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (Aldrich, 0,029 g, 0,15 mmol, 1,2 equivalentes) foram

dissolvidos em acetonitrilo (15 ml) sob atmosfera de azoto com arrefecimento com gelo. A temperatura foi aumentada gradualmente à temperatura ambiente durante o período de tempo de 2 horas e a mistura foi então agitada à temperatura ambiente durante a noite. A solução de reação foi arrefecida outra vez até 0°C, solução aquosa 25-30% da amina correspondente (preparada de um reagente puro obtido de Aldrich) (0,1 ml) foi adicionada e a agitação foi continuada com arrefecimento por 30 minutos e, então, à temperatura ambiente por 2 horas. Acetonitrilo (5 ml) foi adicionado à mistura de reação e os voláteis foram removidos a vácuo. O resíduo semissólido foi purificado por cromatografia de sílica gel (EMD, 0,040-0,063 mm) (solvente de revelação: 3-5% de gradiente metanol-diclorometano) para dar os amidos correspondentes em rendimento 80-87%.

O produto da etapa precedente foi dissolvido em diclorometano seco (10 ml) sob atmosfera de azoto e solução etérea 1M de ácido clorídrico (Aldrich) (1 ml) foi adicionada enquanto mantendo a temperatura a- baixo de 30°C. A mistura de reação foi agitada durante a noite sob atmosfera de azoto. O precipitado foi filtrado, lavado com diclorometano (2 ml) e éter dietílico (2 ml) e seco sob alto vácuo para dar um sal de cloridrato dos compostos correspondentes 64 - 68 e 70 - 78 em rendimento de 75-84% e pelo menos em pureza de 98%.

5. Síntese do Composto 80: ácido (2S, 4R)-1-(2-acetamidoacetil)-4- benzamidopirrolidina-2-carboxílico

A uma solução de ácido (2S4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (0,05 g, 0,17 mmol) e trietilamina (Aldrich) (0,19 ml, 1,37 mmol, 8 equivalentes) em acetona (3 ml) foi lentamente adicionado anidrido acético (0,13 ml, 1,37 mmol, 8 equivalentes) com

agitação à temperatura ambiente sob a atmosfera de azoto. A mistura foi agitada por 3 horas enquanto monitorada por LCMS. Mediante conclusão, os voláteis foram removidos a vácuo e o resíduo foi purificado por HPLC preparativa (coluna: Xterra MSC18 50 x 250 m, 10u) usando 40/60 a 90/10 de gradiente metanol/água (ácido fórmico 0,1% em metanol e ácido fórmico 0,1 em água) para dar 0,020 g (rendimento de 35%) do produto desejado como sólido branco com solubilidade limitada em solventes orgânicos.

6. Síntese do Composto 81: ácido (2S, 4R)-4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico

A uma solução de 4-benzamidopirrolidina-2-carboxilato de (2S, 4R)-metilo (intermediário na síntese do Composto 2) (0,05 g, 0,20 mmol), cloridrato de 1-(3,3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (Aldrich) (0,043 g, 0,22 mmol, 1,1 equivalentes), monohidrato de 1-hidroxibenzotriazol (Aldrich) (0,030 g, 0,22 mmol, 1,1 equivalentes) e ácido 2-(*terc*-butoxicarbonil(metil)amino)acético (Aldrich) (0,038 g, 0,20 mmol) em diclorometano anidro (10 ml) foi adicionada *N*-metilmorfolina (0,05 ml) sob atmosfera de azoto a 0°C. A mistura de reação foi deixada aquecer à temperatura ambiente durante o período de tempo de 2 horas e agitada durante a noite à temperatura ambiente. Os voláteis foram removidos a vácuo e o resíduo foi purificado por cromatografia de sílica gel (EM), 0,040-0,063 mm) (solvente de revelação: metanol/diclorometano gradiente 3-5%) para dar 0,064 g (rendimento de 75%) do produto de acoplamento 4-benzamido-1-(2-(*terc*-butoxicarbonil(metil)amino)acetil)pirrolidina-2-carboxilato de (2S, 4R)- metilo.

A uma solução do amido acima mencionado (0,064 g, de 0,15 mmol) em metanol (5 ml) foi adicionada solução aquosa

2N de hidróxido de sódio (0,38 ml, dos 0,75 mmol, 5 equivalentes) a 0°C sob atmosfera de azoto durante 5 minutos. A reação foi monitorada por LCMS e terminada em 2 horas. Ácido clorídrico 2N aquoso (Aldrich) (0,38 ml, 0,75 mmol, 5 equivalentes) foi adicionado a 0°C durante 5 minutos. Metanol foi destilado sob vácuo. Acetato de etilo (10 ml) e água (1 ml) foram adicionados. A fase aquosa foi saturada com cloreto de sódio e as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com acetato de etilo (2x10 ml). As frações orgânicas combinadas foram secadas sobre o sulfato de magnésio e concentradas para dar um produto espumoso branco ácido (2S, 4R)-4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilo (metil)amino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico que foi usado na etapa seguinte sem purificação.

O ácido da etapa precedente foi dissolvido em diclorometano seco (10 ml) sob atmosfera de azoto e solução etérea 1M de ácido clorídrico (Aldrich) (1 ml) foi adicionada enquanto mantendo a temperatura a- baixo de 30°C. A mistura de reação foi agitada durante a noite sob atmosfera de azoto. O precipitado formado foi filtrado, lavado com diclorometano (2 ml), éter dietílico (2 ml) e seco sob alto vácuo. O produto foi ainda purificado por HPLC preparativa (coluna: Xterra MSC18 19 x 150 mm) usando gradiente metanol/água de 5% a 95% (ácido fórmico 0,1% em metanol e ácido fórmico 0,1% em água) para dar 0,026 g (38% sobre 3 etapas) do produto desejado.

7. Síntese do Composto 82: ácido (2S, 4R)-4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico.

A uma solução de ácido (2S4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (Composto 2, 0,05 g,

0,17 mmol) e trietilamina (Aldrich) (0,048 ml, 0,34 mmol, 2 equivalentes) em acetona (3 ml) foi adicionado lentamente anidrido trifluoroacético (0,024 ml, 0,17 mmol) com agitação à temperatura ambiente sob atmosfera de azoto. A mistura foi agitada por 1,5 horas com monitoração cuidadosa por LCMS. Mediante conclusão, os voláteis foram removidos a vácuo e o resíduo foi purificado por HPLC preparativa (coluna: Xterra MSC18 50 x 250 mm, 10u) gradiente metanol/água de 5% a 90% (ácido fórmico 0,1% em metanol e ácido fórmico 0,1% em água) para dar 0,012 g (rendimento de 18%) do produto desejado.

8. Síntese do Composto 84: ácido (2S, 4R)-4-benzamido-1-(2-(dimetilamino)acetil) pirrolidina-2-carboxílico

A uma solução de ácido (2S4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (Composto 2, 0,05 g, 0,17 mmol) em metanol (3 ml) à temperatura ambiente foi adicionado formaldeído aquoso 37% (Aldrich) (0,1 ml). A mistura resultante foi agitada nesta temperatura por 3 horas, a seguir arrefecida até 0°C e cianoborohidreto de sódio (Aldrich) (0,043 g, 0,69 mmol, 4 equivalentes) foi adicionado em parcelas durante 5 minutos. Após agitação por 1 hora a temperatura ambiente, o solvente foi removido a vácuo e o resíduo sólido foi purificado por HPLC preparativa (coluna: XTerra MS C18, 5u, 19x150mm) usando gradiente de metanol/água de 5% a 95% (ácido fórmico 0,1% em metanol e ácido fórmico 0,1% em água) para dar 0,017 g (rendimento de 31%) do produto desejado.

9. Síntese do Composto 85: ácido (2S, 4R)-4-benzamido-1-(2-formamidoacetil) pirrolidina-2-carboxílico.

Anidrido acético (Acros) (0,32 ml, 3,4 mmol, 10 equivalentes) foi adicionado gota a gota a uma solução de

ácido (2S4R) 1-(2-amino-acetil)-4- benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico (Composto 2, 0,1 g, 0,34 mmol, 1 equivalente) em ácido fórmico (J.T.Baker) (1 ml) a 0°C. Depois que a adição estava completa, a mistura de reação foi deixada aquecer até a temperatura ambiente e agitada por 24 horas adicionais. A mistura de reação foi monitorada por TLC e LCMS. Um montante suplementar de anidrido acético (0,32 ml, 3,4 mmol, 10 equivalentes) foi adicionado e a mistura de reação foi agitada por 24 horas à temperatura ambiente. Água gelada (1 ml) foi adicionada e os voláteis foram removidos a vácuo para render um produto bruto oleoso que foi ainda purificado por HPLC (coluna: Water Atlantis 19 x 150 milímetros) usando ácido fórmico 0,1% em H₂O/MeOH 20-40% MeOH durante 15 minutos de gradiente para dar 0,031 g (29%) do produto desejado.

Os procedimentos gerais esboçados acima foram usados para a síntese dos compostos exemplares listados no Quadro 1.

Quadro 1

Composto	Nome	MH+ encontrado	MH+ calculado	Pureza de HPLC	% de Rendimento
1	ácido (2S4R) 1-(2-Amino-acetil)-4-(4-nitro- benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	336,17	336,11	89	18
3	ácido (2S4R) 1-(2-Amino-acetil)-4-(4-metil- benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	305,2	305,14	87	28
4	ácido (2S4R) 1-(2-Amino-acetil)-4-(4-metoxi- benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	321,18	321,13	95	37
6	ácido (2S4R) 1-(2-Amino-4-carboxi-(referência) butyryl)-4- benzoilamino-pirrolidina-2- carboxílico	363,16	363,14	97	18
11	ácido (2S4S) 1-(2-Amino-acetil)-4-(4-metoxi- benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	321,05	321,13	99	36
12	ácido (2S4S) 1-(2-Amino-acetil)-4-(4-metil- benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	305,27	305,14	99	37

13	ácido (2S4S) 1-(2-Amino-acetil)-4-(4-nitro- benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	336,18	336,11	99	40
14	ácido (2S4S) 1-(2-Amino-acetil)-4-(benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico	291,29	291,12	99	15
24	ácido 3-(2-Amino-acetilamino)-5-(4-(referência)metil- benzoilamino)-benzoico	327,22	327,12	99	25
26	ácido 3-(2-Amino-acetilamino)-5-(referência)benzoilamino- benzoico	313,13	313,11	99	10
28	ácido (2S4R) {[4-(4-Nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	336,19	336,11	97	39
29	ácido (2S4R) {[4-(4-Metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	321,29	321,13	97	30
30	ácido (2S4R) 2- {[4-(4-Metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	305,28	305,14	98	28
35	ácido (2S4S) {[4-(benzoilamino)-pirrolidina-2- carbonil]-amino}-acético	291,29	291,12	95	24
36	ácido (2S4S) {[4-(4-Metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	321,35	321,13	97	33
37	ácido (2S4S) {[4-(4-Nitro-benzoilamino)-pirrolidina- 2-carbonil]-amino}-acético	336,09	336,11	92	37
38	ácido (2S4S) {[4-(4-Metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carbonil]-amino}-acético	305,29	305,14	95	41.
39	ácido [2-Amino-3-(4-benzoilamino-fenil)-acetilamino]-acético	341,22	341,14	98	20
40	ácido {2-Amino-3-[4-(4-metoxi-benzoilamino)-fenil]-acetilamino}-acético	371,28	371,15	93	56
41	ácido {2-Amino-3-[4-(4-Nitro-benzoilamino)-fenil]-acetilamino}-acético	386,28	386,12	93	45
42	ácido {2-Amino-3-[4-(4-metil benzoilamino)-fenil]-acetilamino}-acético	355,25	355,15	77	40
43	ácido [(1-Benzoil-imidazolidina-2-carbonil)-amino]-acético	277,17	277,11	90	22
44	ácido {[1-(4-nitro-benzoil)-imidazolidina-2- carbonil]-amino}-acético	322,15	322,09	95	24
48	ácido (3-Amino-5-benzoilamino-(referência)benzoilamino)-acético	313,33	313,11	98	22
49	ácido (3-Amino-5-(4-metoxi-benzoilamino)-benzoilamino)-acético	343,29	343,12	89	45
50	ácido (3-Amino-5-(4-metil-benzoilamino)-benzoilamino)-acético	327,21	327,12	96	40
51	ácido (3,5-di-Amino-benzoilamino)-(referência)acético	209,11	209,08	98	51

52 (referência)	ácido (2S,4R) 4-Benzoilamino-1-(2-hidroxi- acetil)-pirrolidina-2-carboxílico	292,15	292,29	93	25
54 (referência)	ácido 3-Benzoilamino-5-(2-hidroxi-acetilamino)-benzoico	314,10	314,09	96	12
56 (referência)	amida de ácido 1-Benzoil-3-(2-hidroxi-acetil)-imidazolidina-2-carboxílico	278,12	278,09	95	17
64	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxamida	291	291,1	98	77
65	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida	305	305,1	>99	82
66	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida	317,1	318,1	>99	76
67	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida	333,2	333,2	>99	81
68	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida	331,3	331,2	99	84
69	(2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxamida	391	391,2	>99	80
70	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida	361,1	361,2	>99	81
71	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida	359	359,2	99	81
72	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirroildine-2-carboxamida .	347	347,2	99	79
73	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida	345	345,2	>99	78
74	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida	346,9	347,2	>99	83
75 (referência)	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(tetrahydro-2H-piran-4-il)pirrolidina-2-carboxamida	374,9	375,2	>99	75
76	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzemido-N-((R)-3-metilbutan-2 il)pirrolidina-2-carboxamida	361	361,2	99	80
77	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-3,3-dimetilbutan-2-il)pirrolidina-2-carboxamida	374,9	375,2	99	83
78 (referência)	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-fenilpirrolidina-2-carboxamida	367,2	366,9	99	82
79 (referência)	(2S,4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-((R)-tetrahydrofuran-3-il)pirrolidina-2-carboxamida	360,3	380,2	>99	13
80	ácido (2S,4R) 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidapirrolidina-2-carboxílico	334,1	334,1	>99	35
81	(2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)-pirrolidina-2-ácido carboxílico	306,2	306,1	>99	38
82	ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrollidine-2-carboxílico	388	388,1	>99	18

83	ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico	392,3	392,2	>99	30
84 (referência)	ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-(dimetilamino) acetil)pirrolidina-2-carboxílico	320	320,1	>99	31
85	ácido (2S,4R) 4-benzamido-1-(2-formamidoacetil) pirrolidina-2-carboxílico	320,1	320,1	>99	29

G. Dados do ensaio biológico

1. Efeito dos compostos em arritmias induzidas por cálcio

O efeito antiarrítmico dos compostos de acordo com os presentes ensinamentos foi testado num modelo de arritmias induzidas por cálcio de acordo com o modelo de Lynch et al., J. Cardiovasc. Pharmacol. (1981), 3: 49-60. Ratinhos CD-1 machos foram anestesiados com Cetamina (75 mg/kg) e medetomidina (1 mg/kg) IP. Uma cânula i.v. foi introduzida na veia da cauda. Um sinal de ECG da derivação II foi registado continuamente posicionando elétrodos de aço inoxidável de ECG sobre o membro frontal direito e o membro frontal esquerdo. O elétrodo de terra foi colocado no membro traseiro direito. O sinal foi amplificado e filtrado usando componentes do fisiógrafo Gould e o software de aquisição de dados po-ne-mah. Após um período de equilíbrio de 90 segundos composto de teste foi injetado na veia da cauda (durante 30 segundos). Os ratinhos pré-tratados com veículo (salina 0,9%) foram testados como animais de controlo. O volume de injeção foi de 100 µl/ratinho de 30 g em todas as experiências. Infusão de CaCl₂ (30 mg/ml, 0,1 ml/min/ratinho de 30 g, 100 mg/kg/min) foi começada 3 minutos após administração IV de fármaco ou veículo. O retardo de tempo para o início do bloco de condução cardíaco foi determinado como o tempo do começo da infusão de CaCl₂ até o primeiro evento arrítmico ocorrido. O primeiro bloco de condução foi definido como o primeiro

intervalo RR, maior do que ou igual a 3 vezes um intervalo RR do período do pré- tratamento. O primeiro evento arritmico ocorrendo foi ou um bloco AV de segundo grau (falha intermitente da condução de AV caracterizada por uma onda P sem o complexo concomitante de QRS) ou um bloco SA de segundo grau (intervalo RR prolongado e um complexo QRS sem uma onda P precedente).

Ratinhos pré-tratados com veículo (salina 0,9%) foram testados em todos os dias como uma medida para o nível de controlo em animal não tratado. O volume da injeção foi de 10 µl em todas as experiências. O retardo de tempo para o início de arritmias foi determinado como o tempo do começo da infusão de CaCl_2 até o primeiro evento de bloco de condução definido como falha intermitente da condução de AS ou AV caracterizada por ativação retardada de onda P (bloco SA) ou uma onda P sem o complexo QRS concomitante (bloco AV). O retardo de tempo para início de bloco AV é dado no Quadro 2.

Quadro 2

Composto	Tempo para bloco AV (s)
Solução salina (controlo)	62 - 78

2	134,7
6	117,9
26	122,8
52	135,6
54	121,7
56	128,1
64	111,7
65	115,2
66	122,7
67	134,4
68	143,8
80	111,5
81	123,2
82	113,8
83	110,9
84	108,8

Provém dos dados apresentados no Quadro 2 que o pré-tratamento de um ratinho com uma série de compostos dos presentes ensinamentos resultou num aumento consistente no tempo para um bloco AV no ratinho após infusão de CaCl_2 . Os compostos dos presentes ensinamentos exibem, assim, propriedades antiarrítmicas.

2. Efeito dos compostos na redução de condução atrial induzida por stress metabólico

A habilidade de manter a condução durante stress metabólico foi testada num modelo *in vitro* como descrito por Haugan et al. (J. Cardiovasc. Electrophysiol., 2005:16: 537-545). Ratos (300-400 g) foram mortos com um golpe brusco no pescoço. O coração foi extirpado rapidamente e transferido para um prato pequeno contendo tampão Tyrodes modificado oxigenado a 37° (em mM): NaCl 136, KCl 4, MgCl_2 0,8, CaCl_2 1,8 HEPES 5, MES 5, Glicose 6, pH 7,3. O átrio

esquerdo foi dissecado com cuidado e uma amostra de tecido de 2x6 mm aproximadamente foi retirada do apêndice atrial esquerdo e colocada numa câmara de tecido (volume 5 ml) (Steiert Organ Bath, Hugo Sach Electronic, Alemanha). A câmara ficou em perfusão durante todo o estudo com tampão Tyrodes a 37°C a uma taxa de 10 ml/minuto.

Um eletrodo bipolar de estimulação (aço inoxidável revestido com Teflon, diâmetro de 75 µm) foi colocado numa extremidade do tecido. A estimulação foi conduzida a 1 Hz usando pulsos retangulares no dobro do limiar (duração do estímulo 0,2 ms) libertados por um estimulador (Hugo Sachs, Tipo 215) através de uma unidade da isolação (Universal Isolated Stimulator Unit tipo 263, Hugo Sachs, Alemanha).

Dois microeletrodos separados de irídio puro (World Precision Instruments, impedância da ponta 3,5-4,0 MQ) foram colocados numa linha ao longo do eixo longitudinal da preparação para gravar CV atrial. As distâncias do eletrodo de estimulação para o primeiro e o segundo microeletrodos são de 1,5-2,0 mm e 3,0-4,0 mm, respetivamente. Cada microeletrodo foi conectado a um pré-amplificador do estágio principal (amplificação de 10x os sinais). Os pré-amplificadores foram conectados a um módulo amplificador de biopotencial que foi conectado ao sistema de aquisição de dados através de um Hugo Sachs PLUGSYS. Os sinais foram filtrados a 1 kHz e amostrados a 10 kHz.

Depois de um período de equilíbrio de 30 minutos, regulagem a 1 Hz foi iniciada. Durante os primeiros 20 minutos de período de gravação (período da linha de base), a câmara ficou em perfusão com tampão Tyrodes oxigenado a 37°C, pH 7,3. Então, a amostra de teste (Composto 2) ou controlo foi adicionada ao tampão de perfusão para um outro período de 20 minutos (período de pré-tratamento). Depois

dos 20 minutos de pré- tratamento, a perfusão foi mudada para um tampão Tyrodes não oxigenado, isento de glicose a 37°C, pH 7,3 (com ou sem compostos do interesse) por 40 minutos (período de stress metabólico). Os resultados destas experiências são mostrados graficamente na figura 1.

Com referência à figura 1, em preparações que contêm o controlo, a velocidade de condução diminuiu em 22%. Em contraste, em preparações tratadas com o Composto 2, a velocidade de condução atrial não mudou em comparação com a linha de base.

Segue-se dos dados apresentados na figura 1 que o pré-tratamento de uma tira atrial de ratinho isolada com um composto dos presentes ensinamentos impediu significativamente a redução de condução cardíaca induzida por stress metabólico. As doenças cardíacas tais como fibrilação atrial, a vibração atrial, taquicardia ventricular e fibrilação ventricular são todas caracterizadas pela presença de redução de condução cardíaca anormal. Assim, por meio do efeito na condução cardíaca, espera-se que os compostos dos presentes ensinamentos exerçam efeitos antiarrítmicos.

3. Ensaio da estabilidade de plasma

Para prever sua estabilidade de plasma, os compostos dos presentes ensinamentos foram incubados em plasma de ratinho macho (1:1 plasma:tampão pH 7,4) a concentração de 1 μ M a 37°C. Após 3 horas, a reação foi arrefecida abruptamente com acetonitrilo fria. A solução foi centrifugada e o sobrenadante foi analisado com LC-MS usando as seguintes condições de HPLC: coluna Thermo Hypersil-Keystone Aquasil C18 (50mm x 2,1 mm, 5 μ M) a temperatura ambiente; Solvente A: ácido fórmico 0,1% em

água; Solvente B: ácido fórmico 0,1% em acetonitrilo; gradiente de solvente: 100% A a 50% A durante 2,5 min, a 10% A durante 1,5 min e retornando a 100% A e reequilibrando por 1,5 minuto; taxa de fluxo: 0,8 ml/minuto A percentagem de composto restante foi calculada dividindo as contagens de área de sinal LC-MS de amostra de incubação de 3 horas pelo tempo = contagens de área. Os resultados destas experiências estão resumidos no Quadro 3 a seguir.

Quadro 3

Composto	% Restante
2	93
64	27
65	87
66	100
67	100
68	96
69	92
70	93
71	90
72	88
73	95
80	100
81	100
82	34
83	100
84	100
85	107

4. Ensaio de Estabilidade Metabólica

Para prever a estabilidade do composto sob o metabolismo da primeira passagem (Fase I), compostos dos presentes ensinamentos foram incubados em microssomas de fígado de ratinho macho a concentração de 1 μ M e

concentração de proteína de 0,5 mg/ml a 37°C. Após 15 minutos, a reação foi arrefecida rapidamente com acetonitrilo fria. A solução foi centrifugada e o sobrenadante foi analisado com LC-MS usando as condições de HPLC descritas na seção 3 acima. A percentagem restante foi calculada dividindo as contagens de área LC-MS da amostra de 15 minutos de incubação pelo tempo = 0 contagens de área e a meia vida do composto foi derivada usando a cinética de reação de primeira ordem. Baseado neste ensaio, os Compostos 2, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 80, 81, 82, 83 e 84 tiveram semividas maiores do que 30 minutos em microsomas de fígado de ratinho macho.

5. Modelo de Tamanho de Infarto Canino e Arritmia de Reperusão

O Composto 2 foi testado em cães submetidos a uma oclusão da artéria coronária de 60 minutos e reperusão de 4 horas, como descrito por Hennan et al. (J. Exp. Pharmacol. Ther., 317, 236-43 (2006)). O composto 2 foi administrado IV 10 minuto antes da reperusão como um bolus + infusão IV em doses de: 0,25 µg/kg de bolus + 0,19 µg/kg/h de infusão (n=6); 2,5 µg/kg de bolus + 1,9 µg/kg/h de infusão (n=7); 25 µg/kg de bolus + 19 µg/kg/h de infusão (n=6); 75 µg/kg de bolus + 57 µg/kg/h de infusão (n=5); controlo de veículo (n=7). Complexos ventriculares prematuros (PVCs) foram quantificados durante a reperusão. Quatro ou mais PVCs consecutivos foram definidos como taquicardia ventricular (VT). A incidência total de VT foi reduzida significativamente com as duas doses mais elevadas de Composto 2 (eventos $1,7 \pm 0,8$; $2,2 \pm 1,4$; $p < 0,05$) em comparação com os controlos ($23 \pm 6,1$). Os PVCs totais foram reduzidos significativamente de $11,1 \pm 1,6\%$ em animais de controlo para $2,0 \pm 0,7\%$ e $1,8 \pm 0,8\%$ após as duas doses mais altas de Composto 2. O tamanho de infarto, expresso como

percentagem do ventrículo esquerdo, foi reduzido significativamente de $19,0 \pm 3,5$ em controlos para $7,9 \pm 1,5$ e $7,1 \pm 0,8\%$ ($p < 0,05$) nas duas doses mais altas de Composto 2. Estes resultados demonstram que os compostos dos presentes ensinamentos são compostos antiarrítmicos potentes com efeitos cardioprotetores.

6. Modelo de Inchamento de célula *in vitro* e Retomada de Tintura

Péptidos capazes de demonstrar citoproteção podem ser identificados num modelo *in vitro* de inchamento de célula induzido por isquemia e retomada de tintura. Nesta experiência, o efeito do Composto 2 na retomada de tintura de calceína induzido pela inibição metabólica em células de glioma C6 cultivadas que sobre-expressam conexina 43 foi estudado. As células foram incubadas sob condições de controlo e durante isquemia simulada (SI) por 40 minutos na presença de calceína (200 μM). Em seguida a incubação as células foram submetidas a microscopia de epifluorescência para determinar a retomada de calceína. A incubação de células C6 em meio SI aumentou a retomada de tintura em 5 vezes acima dos valores de controlo. A retomada foi inibida dependentemente da dose pelo Composto 2 e a retomada mínima foi obtida a 100 μM de Composto 2 (32% de redução relativa da resposta induzível de SI; $p < 0,05$ versus veículo). As células de controlo exibiram inchamento de célula durante o período de stress de 40 minuto, ao passo que as células tratadas com o Composto 2 não.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente

européia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- US 4775743 A [0005]
- WO 2004048400 A [0006]
- WO 02077017 A [0092] [0108] [0110]
- WO 9811125 A [0145]

Literatura não relacionada com patentes referida na descrição

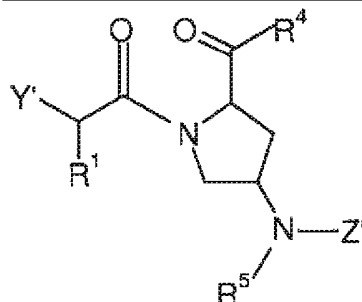
- Cell Interactions and Gap Junctions. CRC Press, Inc, 1989 [0002]
- GUERRERO et al. *J. Clin. Invest.*, 1997, vol. 99, 1991-1998 [0004]
- LERNER et al. *Circulation*, 2000, vol. 101, 547-552 [0004]
- KAPRELIAN et al. *Circulation*, 1998, vol. 97, 651-660 [0004]
- PETERS et al. *Circulation*, 1993, vol. 88, 864-875 [0004]
- SAFFITZ et al. *Cardiovasc. Res.*, 1999, vol. 42, 309-317 [0004]
- AONUMA et al. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, 1980, vol. 28, 3332-3339 [0005]
- DHEIN et al. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.*, 1994, vol. 350, 174-184 [0005]
- MULLER et al. *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, vol. 327, 65-72 [0005]
- HAUGAN et al. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.*, 2005, vol. 16, 537-545 [0008] [0112] [0197]
- R. B. SILVERMAN. *The Organic Chemistry of Drug Design*

- and Drug Action. Academic Press, 1992 [0033]
- Pro-drugs as Novel Delivery Systems. **T. HIGUCHI ; V. STELLA**. A.C.S. Symposium Series, and in Bioreversible Carriers in Drug Design. American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987, vol. 14 [0084]
 - Remington's Pharmaceutical Sciences. Mark Publishing Company, 1985 [0086]
 - **CHRIST et al.** *Braz. J Med Biol. Res.*, 2000, vol. 33, 423-429 [0097]
 - **MONTECINO-RODRIGUEZ et al.** *Blood*, 2000, vol. 96, 917-924 [0099]
 - **PRESLEY et al.** *IGJC 2005*, 2005 [0099]
 - **LYNCH et al.** *J Cardiovasc. Pharmacol.*, 1981, vol. 3, 49-60 [0111]
 - Principles and practice of solid-phase peptide synthesis. **FIELDS et al.** *Synthetic Peptides*. 2002 [0120]
 - *European Journal of Medicinal Chemistry*, 1989, vol. 24 (6), 623-5 [0122]
 - *Tetrahedron: Asymmetry*, 2003, vol. 14 (20), 3141-3152 [0137] [0139]
 - *Journal of Heterocyclic Chemistry*, 1998, vol. 35 (6), 1533-1534 [0138]
 - *Journal of Medicinal Chemistry*, 2001, vol. 44 (18), 2990-3000 [0139] [0141]
 - **B. D. LARSEN ; A. HOLM**. *Int. J. Pept. Protein Res.*, 1994, vol. 43, 1-9 [0153]
 - **LYNCH et al.** *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 1981, vol. 3, 49-60 [0194]
 - **HENNAN et al.** *J. Exp. Pharmacol. Ther.*, 2006, vol. 317, 236-43 [0205]

Lisboa, 21 de Janeiro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto representado pela Fórmula III:



ou um sal farmacêuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, em que:

R^1 é hidrogénio;

Y' é NR^2R^3 em que R^2 é hidrogénio, e R^3 é selecionado a partir de hidrogénio, C_{1-10} alquilo, $C(O)R^6$ e $C(O)OR^6$;

R^4 é OH ou NH_2 ;

R^5 e R^6 são independentemente selecionados a partir de hidrogénio e C_{1-10} alquilo;

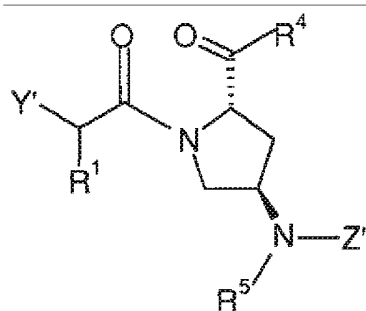
e

Z' é benzoilo, opcionalmente substituído com 1 a 5 grupos Q, em que cada grupo Q é independentemente selecionado a partir de F, Cl, Br, I, C_{1-10} alquilo, CF_3 , OCF_3 , NO_2 , $O-C_{1-10}$ alquilo, OH, NH_2 , $NH(C_{1-10}$ alquilo), $N(C_{1-10}$ alquilo) $_2$, e $NHC(O) C_{1-10}$ alquilo.

2. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que R^3 é hidrogénio.

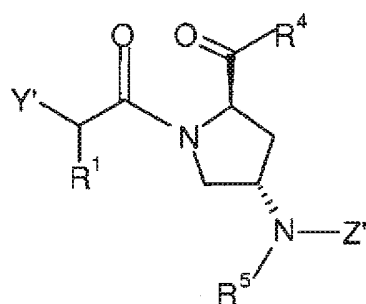
3. O composto de acordo com a reivindicação 1, em que R^3 é $C(O)R^6$, e R^6 é hidrogénio ou C_{1-10} alquilo opcionalmente substituído.

4. O composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 que tem a seguinte estrutura:



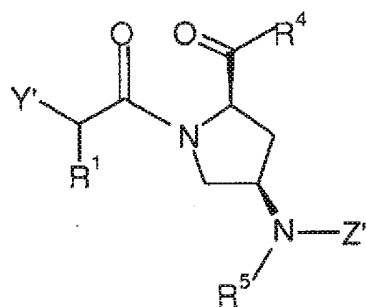
ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

5. O composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 que tem a seguinte estrutura:



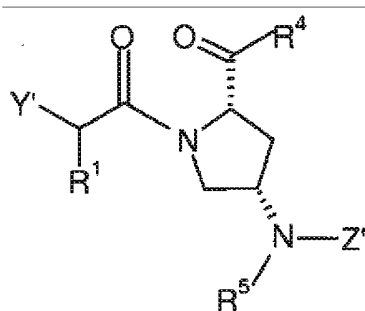
ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

6. O composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 que tem a seguinte estrutura:



ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

7. O composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3 que tem a seguinte estrutura:



ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

8. O composto de acordo com a reivindicação 1 que é:

ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

ou

ácido 1-(2-amino-acetil)-4-(4-hidroxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

9. O composto de acordo com a reivindicação 1 ou 8 que é:

ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-nitro-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metil-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-metoxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico, ou

ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-(4-hidroxi-benzoilamino)-pirrolidina-2-carboxílico;

ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

10. Um composto que é:

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida;

ou

ácido 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico;

ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

11. O composto de acordo com a reivindicação 10 que é:

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-metilpirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-etilpirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isopropilpirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopropilpirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-(pentan-3-il)pirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclopentilpirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-isobutilpirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-ciclobutilpirrolidina-2-carboxamida;

(2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamido-N-terc-butilpirrolidina-2-carboxamida;

ou

ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)acetil)pirrolidina-2-carboxílico;

ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

12. O composto de acordo com a reivindicação 1 que é:

ácido 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico;

ácido 4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido 4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxílico;

ácido 4-benzamido-1-(2-formamidoacetil)pirrolidina-2-carboxílico;

1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxamida;

ou

4-benzamido-1-(2-(terc-butoxicarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxamida;

ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

13. O composto de acordo com a reivindicação 1 ou 12 que é:

ácido (2S, 4R) 1-(2-acetamidoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-carboxílico;

ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(metilamino)acetil)-pirrolidina-2-carboxílico;

ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-

butoxycarbonilamino)acetil)pirrolidina-2- carboxílico;
 ácido (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-
 formamidoacetil)pirrolidina-2-carboxílico;
 (2S, 4R) 1-(2-aminoacetil)-4-benzamidopirrolidina-2-
 carboxamida; ou
 (2S, 4R) 4-benzamido-1-(2-(terc-
 butoxycarbonilamino)acetil)pirrolidina-2-carboxamida;
 ou um sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo.

14. O composto de acordo com a reivindicação 1 que é ácido
 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-pirrolidina-2-
 carboxílico, ou um sal farmaceuticamente aceitável ou
 hidrato do mesmo.

15. O composto de acordo com a reivindicação 14 que é
 ácido (2S, 4R) 1-(2-amino-acetil)-4-benzoilamino-
 pirrolidina-2-carboxílico, ou um sal farmaceuticamente
 aceitável ou hidrato do mesmo.

16. Uma composição farmacêutica que compreende um composto
 de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 ou um
 sal farmaceuticamente aceitável ou hidrato do mesmo, e um
 veículo farmaceuticamente aceitável.

17. Um composto de acordo com qualquer uma das
 reivindicações 1 a 15 para utilização em terapêutica.

18. Um composto de acordo com qualquer uma das
 reivindicações 1 a 15 para utilização num método de
 prevenção ou tratamento de uma condição patológica, em que
 a condição patológica é isquemia.

19. Um composto de acordo com qualquer uma das
 reivindicações 1 a 15 para utilização num método de
 prevenção ou tratamento de lesão isquêmica em um ou mais

órgãos de um mamífero.

20. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 para utilização num método de prevenção ou tratamento de uma condição patológica, em que a condição patológica é doença cardiovascular.

21. Um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 para utilização num método de prevenção ou tratamento de uma condição patológica de acordo com a reivindicação 20, em que a doença cardiovascular é fibrilação atrial, palpitação atrial, taquicardia ventricular ou fibrilação ventricular.

22. O composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 para utilização num método de prevenção ou tratamento de uma condição patológica de qualquer uma das reivindicações 18 a 21, em que o composto é formulado para a administração parentérica ou oral.

23. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma condição patológica, em que a condição patológica é isquemia.

24. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de lesão isquémica em um ou mais órgãos de um mamífero.

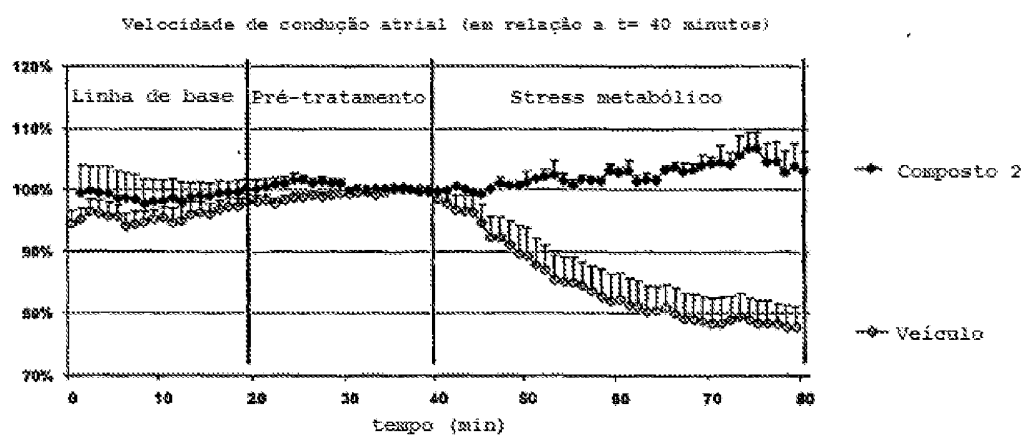
25. Utilização de um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 15 na preparação de um medicamento para a prevenção ou tratamento de uma condição patológica, em que a condição patológica é doença cardiovascular.

26. A utilização de acordo com a reivindicação 25, em que a doença cardiovascular é fibrilação atrial, palpitação atrial, taquicardia ventricular ou fibrilação ventricular.

27. A utilização de acordo com qualquer uma das reivindicações 23 a 26, em que o composto é formulado para a administração parentérica ou oral.

Lisboa, 21 de Janeiro de 2014

1/1

Figura 1