



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

(21) PI 1013958-3 A2



(22) Data do Depósito: 25/06/2010

(43) Data da Publicação Nacional: 06/01/2011

(54) **Título:** COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACEUTICA, USO DO REFERIDO COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO

(51) **Int. Cl.:** C07D 217/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 02/07/2009 US 61/222668; 20/06/2010 US 12/819221.

(71) **Depositante(es):** TETRALOGIC PHARMACEUTICALS CORPORATION.

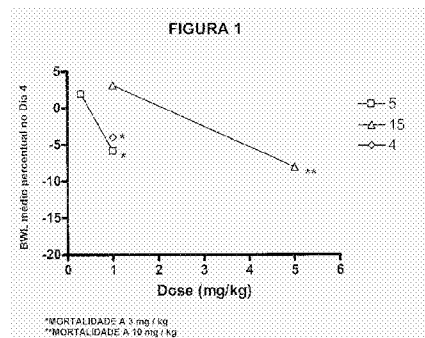
(72) **Inventor(es):** STEPHEN M. CONDON; YIJUN DENG; MATTHEW G. LAPORTE; SUSAN R. RIPPIN.

(86) **Pedido PCT:** PCT US2010039976 de 25/06/2010

(87) **Publicação PCT:** WO 2011/002684 de 06/01/2011

(85) **Data da Fase Nacional:** 29/12/2011

(57) **Resumo:** "COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO REFERIDO COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO" Um mimético de SMAC e composições farmacêuticas do mesmo e métodos de uso.



“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO REFERIDO
COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO”

Campo da Invenção

5 Esta invenção está no campo de miméticos de SMAC e
composições e seus usos para tratar distúrbios proliferativos incluindo
cânceres.

Fundamentos da Invenção

10 Os inibidores das Proteínas de Apoptose (IASP) são proteínas
intracelulares de ocorrência natural que suprimem a apoptose dependente da
caspase. SMAC, também conhecido como DIABLO, é uma outra proteína
intracelular que funciona para antagonizar, isto é, inibir a atividade de IASP.
Em células normais saudáveis, SMAC e IASP funcionam juntos para manter
as células saudáveis. Entretanto, em certos estados de doença, por exemplo,
cânceres e outros distúrbios proliferativos, IASP não são adequadamente
15 antagonizados e portanto impedem a apoptose e causam ou exacerbam a
proliferação e sobrevivência anormal.

Os miméticos de SMAC, também conhecidos como
antagonistas de IAP, são moléculas pequenas sintéticas que imitam a estrutura
e atividade antagonística de IAP dos quatro aminoácidos de terminal N de
20 SMAC (os miméticos de SMAC são algumas vezes aludidos como
antagonistas de IAP). Quando administrados aos animais que sofrem de
distúrbios proliferativos, os miméticos de SMAC antagonizam IASP,
causando um aumento na apoptose entre células que se proliferam de modo
anormal.

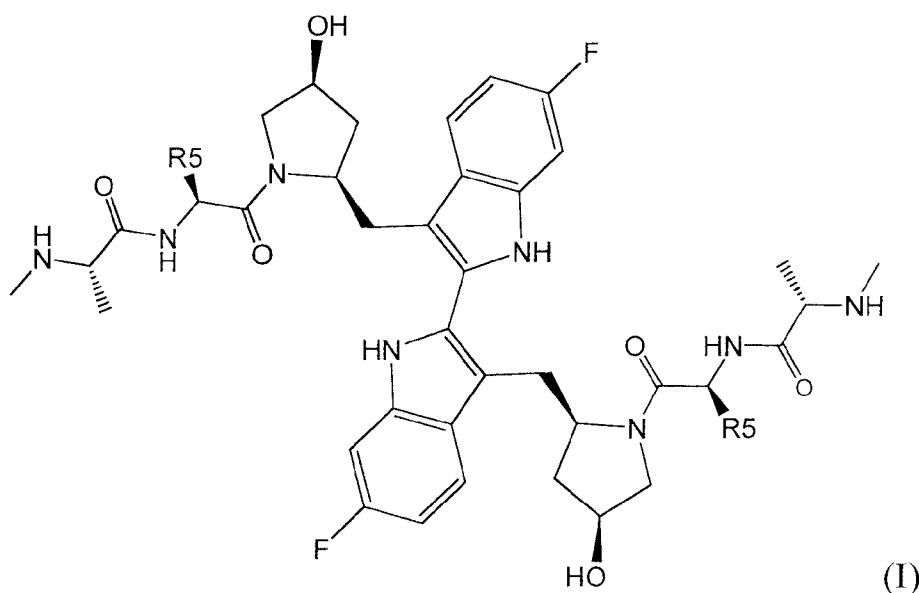
25 Os exemplos de peptidomiméticos de SMAC são aqueles
divulgados na US 7.517.906, US 7.309.792, US 7.419.975, US
2005/0234042, US 2005/0261203, US 2006/0014700, US 2006/0025347, US

2006/0052311, US 2006/0128632, US 2006/0167066, US 2007/0042428, US 2007/032437, US 2008/0132485, WO 2005/069888, WO 2005/069894, WO 2006/010118, WO 2006/122408, WO 2006/017295, WO 2006/133147, WO 2006/128455, WO 2006/091972, WO 2006/020060, WO 2006/014361, WO 2006/097791, WO 2005/094818, WO 2008/045905, WO 2008/016893, WO 2007/136921, WO 2007/021825, WO 2007/130626, WO 2007/106192, e WO 2007/101347.

Sumário da Invenção

Esta invenção, em um aspecto, é N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-
 10 {4S-hidróxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2R-
 ilmetil}-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidróxi-pirrolidino-1-carbonil]-
 propil}-2S-metilamino-propionamida e sais deste farmacêuticamente
 aceitáveis, assim como várias formas de tal composto e sais deste como
 descrito ainda aqui abaixo.

15 Este composto tem a seguinte estrutura:



em que R5 é $-\text{CH}_2\text{CH}_3$. Este composto também é aqui aludido como
 Composto 15.

A invenção, em aspectos relacionados, compreende uma
 composição farmacêutica que compreende tal composto e um método de
 20 tratar um distúrbio proliferativo em um indivíduo mamífero humano ou não

humano em necessidade deste que compreende administrar internamente ao indivíduo uma quantidade eficaz do dito composto ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

5 Em outros aspectos, a invenção compreende um método de tratar um distúrbio proliferativo em um mamífero em necessidade deste, por exemplo, um ser humano, ou um animal de estimação, um animal de alimento, ou um animal de esporte, que compreende administrar internamente ao animal uma quantidade eficaz de Composto 15 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

10 Em uma outra forma de realização ilustrativa, a invenção compreende um método para induzir apoptose em uma célula que compreende contatar a célula com o Composto 15 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo. Nesta forma de realização, a célula pode ser, por exemplo, uma célula cancerosa.

15 Em formas de realização ilustrativas adicionais, a invenção compreende qualquer um mais dos métodos acima que compreende ainda administrar uma segunda terapia relacionada com o câncer, tal como, por exemplo, radiação, quimioterapia, imunoterapia, terapia fotodinâmica, e combinações destes.

20 Em uma outra forma de realização ilustrativa, a invenção compreende um método de tratar uma doença autoimune, em que a condição é causada ou exacerbada pela regulação anormal da apoptose, em um mamífero em necessidade deste, incluindo, por exemplo, lupo eritematoso sistêmico, psoríase, e púrpura trombocitopênica idiopática (*Morbus Werlhof*)
25 que compreende administrar internamente ao animal uma quantidade eficaz de Composto 15 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

Descrição Resumida das Figuras

A Figura 1 mostra a perda de peso corporal média percentual em rato a seguir de 4 dias de dosagem de bolo intravenosa com miméticos de

SMAC substancialmente como descrito no Exemplo 4.

A Figura 2 mostra volume de tumor médio (2A) e mudança no peso corporal (2B) que resulta do tratamento de xenoenxertos humanos em camundongos nus com miméticos de SMAC substancialmente como descrito no Exemplo 5.

Descrição Detalhada da Invenção

O composto da invenção é um mimético de SMAC que pode ser usado no tratamento de distúrbios proliferativos, por exemplo: vários tumores benignos ou tumores malignos (câncer), doenças proliferativas benignas (por exemplo, psoríase, hipertrofia prostática benigna, e restenose), ou doenças autoimunes (por exemplo, glomerulonefrite proliferativa autoimune, respostas autoimunes linfoproliferativas). Os cânceres que potencialmente podem ser tratados com antagonistas de IAP incluem, mas não são limitados a, um ou mais dos seguintes: adenocarcinoma pulmonar, câncer pancreático, câncer colônico, câncer ovariano, câncer mamário, mesotelioma, neuroma periférico, câncer da bexiga, glioblastoma, melanoma, carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado com a AIDS, câncer anal, câncer da bexiga, meningioma, glioma, astrocitoma, câncer mamário, câncer cervical, distúrbios mieloproliferativos crônicos (por exemplo, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielógena crônica), câncer colônico, cânceres endócrinos, câncer endometrial, ependimoma, câncer esofágico, sarcoma de Ewing, tumores de célula germinativa extracraniana, tumores de célula germinativa extragonadal, câncer do ducto biliar extraepático, câncer da vesícula biliar, câncer gástrico, tumores carcinóides gastrointestinais, tumores trofoblástico gestacional, leucemia de célula pilosa, linfoma de Hodgkin, linfoma de não Hodgkin, câncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, carcinoma de célula da ilhota, sarcoma de Kaposi, câncer laríngeo, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, câncer labial, câncer da cavidade oral, câncer hepático, câncer mamário masculino, mesotelioma

5 maligno, meduloblastoma, melanoma, carcinoma de célula de Merkel, câncer de pescoço escamosos metastático, mieloma múltiplo e outros neoplasmas de célula plasmática, fungóides de micose e a síndrome de Sezary, síndromes mielodisplásticas, câncer nasofaríngeo, neuroblastoma, câncer pulmonar de célula não pequena, câncer pulmonar de célula pequena, câncer orofaríngeo, cânceres ósseos, incluindo osteossarcoma e histiocitoma fibroso maligno do osso, câncer epitelial ovariano, tumores de célula germinativa ovariana, tumores de potencial maligno baixo ovarianos, câncer pancreático, câncer do seno paranasal, câncer da paratireóide, câncer peniano, feocromocitoma, 10 tumores pituitários, câncer prostático, câncer retal, câncer de célula renal, retinoblastoma, rabiomiossarcoma, câncer da glândula salivar, câncer de pele, câncer do intestino delgado, sarcoma de tecido mole, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais, pineoblastoma, câncer testicular, timoma, carcinoma tímico, câncer da tireóide, câncer de célula 15 transicional da pelvis renal e uretra, câncer uretral, sarcoma uterino, câncer vaginal, câncer vulvar, e tumor de Wilm e outros tumores renais da infância.

Algumas formas de realização da invenção incluem induzir a apoptose de células, particularmente células que se proliferam de modo patológico. Os métodos podem ser realizados *in vitro* ou *in vivo*.

20 Os métodos da invenção podem incluir a administração do composto da invenção sozinho, administração de uma combinação de antagonistas de IAP, ou administração do composto da invenção, com ou sem um ou mais antagonistas de IAP adicionais, e um ou mais agentes quimioterapêuticos adicionais. A administração de agentes múltiplos pode ser 25 simultânea ou sequencial. Os agentes quimioterapêuticos úteis incluem, mas não são limitados a, agentes de alquilação (por exemplo, ciclofosfamida, mecloretamina, clorambucila, melfalan), antraciclinas (por exemplo, daunorubicina, doxorubicina, epirubicina, idarrubicina, mitoxantrona, valrubicina), rompedores citoesqueléticos (por exemplo, paclitaxel, docetaxel),

epotilonas (por exemplo, epotilona A, epotilona B, epotilona D), inibidores da topoisomerase II (por exemplo, etoposida, teniposida, tafluposida), análogos precusores de análogos de nucleotídeo (por exemplo, azacitidina, azatioprina, capecitabina, citarabina, doxifluridina, fluorouracila, gencitabina, mercaptopurina, metotrexato, tioguanina), antibióticos peptídicos (por exemplo, bleomicina), agentes com base em platina (por exemplo, carboplatina, cisplatina, oxaliplatina), retinóides (por exemplo, ácido retinóico todo trans), e alcalóides vinca e derivados (por exemplo, vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina). Em algumas formas de realização, os agentes quimioterapêuticos incluem fludarabina, doxorubicina, paclitaxel, docetaxel, camptotecina, etoposida, topotecano, irinotecano, cisplatina, carboplatina, oxaliplatina, ansacrina, mitoxantrona, 5-fluoro-uracila, ou gencitabina.

Em algumas formas de realização da invenção, as composições farmacêuticas que compreendem o composto da invenção, sozinho ou em combinação com um ou mais outros ingredientes farmacêuticos ativos, são administrados a um indivíduo humano ou veterinário. As composições farmacêuticas tipicamente compreendem pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável, por exemplo, um carregador ou diluente, e podem ser administrados na maneira convencional pelas vias incluindo as vias sistêmica, tópica, ou oral. A administração é normalmente pela injeção intravenosa, como um bolo ou infusão, mas outras vias de administração não são excluídas. Uma formulação intravenosa pode ser de 1 mg/ml de Composto 15 em PBS tamponado com citrato 0,05 M estéril, pH 5. Os modos específicos de administração dependerão da indicação e de outros fatores incluindo o composto particular que é administrado. A quantidade de composto a ser administrada é aquela quantidade que é terapeuticamente eficaz. A dosagem a ser administrada dependerá das características do indivíduo que é tratado, por exemplo, o paciente particular tratado, idade,

peso, saúde, tipos de tratamento concorrente, se algum. A frequência de tratamentos pode ser facilmente determinada por uma pessoa de habilidade na técnica (por exemplo, pelo médico).

5 Tipicamente, o composto da invenção será administrado pela injeção intravenosa, incluindo, por exemplo, pela infusão em cerca de 1 a cerca de 120 minutos, por exemplo, cerca de 30 minutos.

10 A composição farmacêutica da invenção é uma composição em que o ingrediente farmacêuticamente ativo, isto é, o composto da invenção, é puro o bastante, e a composição é de outro modo adequada, para a administração interna a um ser humano ou outro mamífero. A mesma pode ser preparada na forma de dose unitária, isto é, uma forma adequada para a administração única a um indivíduo. Assim, por exemplo, uma composição farmacêutica na forma de dose unitária intravenosa pode compreender um
15 ou uma fração conveniente de uma quantidade eficaz tal que um dos conteúdos de um frasco ou seringa seja administrado de uma vez. Tal administração pode ser repetida até cerca de 4 vezes ao dia em um período de tempo, se necessário para se obter uma dose eficaz acumulativa, por exemplo, regressão de tumor. Um regime de dosagem pode ser, por exemplo, injeções
20 intravenosas diárias ou duas vezes por semana, ou, por exemplo, injeções semanais em ciclos de três semanas em andamento e uma semana livre contanto que o tratamento seja eficaz, por exemplo, até que a doença progrida ou o medicamento não seja tolerado. A dose eficaz administrada em cada injeção é uma quantidade que é eficaz e tolerada; a mesma pode ser, por
25 exemplo, de 0,01 a 30 mg/m², por exemplo, de 0,2 a 10 mg/m², ou, por exemplo, de 0,5 a 5 mg/m².

O composto da invenção também pode ser aplicado de maneira local, tal como na perfusão de membro isolado. O composto da invenção também pode ser aplicado de maneira tópica, por exemplo, como um creme,

gel, loção, ou unguento, ou em um reservatório ou emplastro do tipo matriz, ou em um sistema de liberação transdérmico ativo.

Uma dose eficaz é aquela que no decorrer da terapia, que pode ser, por exemplo, de 1 ou mais semanas, por exemplo, processos múltiplos de 3 semanas com/1 semana sem, resulta no tratamento do distúrbio proliferativo, isto é, uma diminuição na taxa da progressão da doença, término, regressão ou redução da progressão da doença.

As composições a ser usadas compreendem uma quantidade eficaz do ponto de vista terapêutico de um composto como descrito acima, ou um sal farmacologicamente aceitável ou outra forma deste junto com um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis. A frase “composição farmacêutica” se refere a uma composição adequada para a administração no uso médico. Deve ser apreciado que as determinações das formas de dosagem, quantidades de dosagem, e vias de administração adequadas para um paciente particular estão dentro do nível do técnico habilitado na técnica farmacêutica e médica.

As composições adequadas para a administração parenteral convenientemente compreendem uma preparação aquosa estéril do composto da invenção, que é preferivelmente isotônica com o sangue do paciente. Esta preparação aquosa pode ser formulada de acordo com os métodos conhecidos usando carregadores ou diluentes adequados que podem incluir um tampão.

Quando praticando a terapia de conjunto ou combinação descrita em maiores detalhes abaixo, a administração do composto e das composições da presente invenção pode ocorrer de maneira simultânea com, subsequente a, ou antes da quimioterapia ou radiação, de modo que os agentes quimioterapêuticos ou a radiação sensibiliza o sistema para o composto e para as composições da presente invenção.

A presente invenção também é direcionada ao uso do composto e composições como um agente quimiopotencializador com outro

método de tratamento. O termo “agente quimiopotencializador” se refere a um agente que age para aumentar a sensibilidade de um organismo, tecido, ou célula a um composto, ou tratamento químico, a saber “agentes quimioterapêuticos” ou “quimiomedicamentos” ou para o tratamento por radiação. Deste modo, o composto e as composições da presente invenção podem ser usados para inibir o crescimento tumoral *in vivo* administrando estes em combinação com um agente biológico ou quimioterapêutico ou usando estes em combinação com radiação. Nestas aplicações, a administração do composto e das composições da presente invenção podem ocorrer antes, e com tempo suficiente, para causar a sensibilização do local a ser tratado. Alternativamente, o composto e as composições da presente invenção podem ser usados ao mesmo tempo com radiação e/ou agentes químicos anticâncer adicionais (infra). Tais sistemas podem evitar as administrações repetidas do composto e composições da presente invenção, aumentando a conveniência ao indivíduo e ao médico, e podem ser particularmente adequados para algumas composições da presente invenção.

Os agentes biológicos e quimioterapêuticos/antineoplásticos e radiação induzem a apoptose ativando-se os caminhos extrínsecos ou intrínsecos apoptóticos, e, visto que o composto e as composições da presente invenção realçam os antagonistas das proteínas apoptóticas (IAP) e, deste modo, removem o bloco na apoptose, a combinação de agentes quimioterapêuticos/antineoplásticos e radiação com o composto e composições da presente invenção devem trabalhar de maneira aditiva ou sinérgica para facilitar a apoptose.

Uma combinação do composto da presente invenção e um agente biológico ou quimioterapêuticos/antineoplásticos e/ou terapia de radiação de qualquer tipo que ativa o caminho extrínseco ou intrínseco pode fornecer um more método eficaz para destruir as células tumorais. O composto da presente invenção interage com IAP's, tais como XIAP, cIAP-1,

cIAP-2, ML-IAP, etc., e remove o bloco mediado por IAP da apoptose. A maioria dos agentes quimioterapêuticos/antineoplásticos e/ou terapia de radiação extermina células que se dividem ativamente ativando-se o caminho apoptótico intrínseco levando à apoptose e à morte da célula. Os agentes biológicos antitumorais tais como TRAIL (ligando que induz a apoptose relacionada com TNF) ativam os caminhos apoptóticos extrínsecos. Como é descrito em maiores detalhes abaixo, as formas de realização da invenção fornecem combinações do composto da presente invenção e um agente biológico ou quimioterapêutico/antineoplástico e/ou radiação que fornece uma ação sinérgica contra a proliferação celular indesejada. Esta ação sinérgica entre o composto da presente invenção e um agente biológico ou quimioterapêutico/antineoplástico e/ou terapia de radiação pode melhorar a eficácia do agente biológico ou quimioterapêutico/antineoplástico e/ou terapias de radiação. Isto permitirá um aumento na eficácia dos agentes biológicos ou quimioterapêuticos/antineoplásticos ou tratamentos de radiação que permitem que uma maior porcentagem dos tumores respondam à terapia, uma resposta de tumor melhorada, e, potencialmente, uma redução na dose do agente biológico ou quimioterapêutico/antineoplástico necessário para tratar um tumor, deste modo fornecendo o uso de uma mais tolerável do agente biológico ou quimioterapêutico/antineoplástico e/ou radiação.

Em uma forma de realização da presente invenção, o paciente é tratado administrando-se o composto ou uma composição farmacêutica da presente invenção em um tempo em que o paciente é submetido a à radiação concorrente ou antecedente ou quimioterapia para o tratamento de uma patologia neoproliferativa de um tumor tal como, mas não limitando a, câncer de bexiga, câncer de mama, câncer de próstata, câncer de pulmão, câncer pancreático, câncer gástrico, câncer de cólon, câncer no ovário, câncer renal, hepatoma, melanoma, linfoma, sarcoma, e combinações destes.

Em outra forma de realização da presente invenção, o

composto ou uma composição da presente invenção podem ser administrados em combinação com um agentes biológicos ou quimioterapêuticos e/ou para o uso em combinação com radioterapia, imunoterapia, e/ou terapia fotodinâmica, que promove a apoptose e intensifica a eficácia dos quimioterapêuticos, radioterapia, imunoterapia, e/ou terapia fotodinâmica.

As formas de realização da invenção também incluem um método de tratar um paciente que sofre de câncer através da administração contemporânea ou concorrente de um agente biológico ou quimioterapêutico. Tais agentes biológicos ou quimioterapêuticos incluem mas não são limitados aos agentes quimioterapêuticos descritos em “Modern Pharmacology with Clinical Applications”, Sexta Edição, Craig & Stitzel, Cap. 56, pg 639 a 656 (2004), aqui incorporada por referência. Os agentes quimioterapêuticos podem ser, mas não são limitados aos, agentes de alquilação, antimetabólitos, antibióticos antitumor, produtos derivados de plantas tais como taxanos, enzimas, agentes hormonais, agentes variados tais como cisplatina, anticorpos monoclonais, glicocorticóides, inibidores mitóticos, inibidores da topoisomerase I, inibidores da topoisomerase II, agentes de imunomodulação tais como interferônios, fatores do crescimento celular, citocinas, e compostos antiinflamatórios não esteroidais (NSAID), fatores de crescimento celular e inibidores de cinase. Outras classificações adequadas para os agentes quimioterapêuticos incluem inibidores mitóticos, e agentes antiestrogênicos.

Os exemplos específicos dos agentes biológicos e quimioterapêuticos adequados incluem, mas não são limitados a, cisplatina, carmustina (BCNU), 5-fluorouracila (5-FU), citarabina (Ara-C), gencitabina, metotrexato, daunorrubicina, doxorubicina, dexametasona, topotecano, etoposida, paclitaxel, vincristina, tamoxifeno, TNF-alfa, TRAIL e outros membros, isto é, outros que não TRAIL e TNF-alfa, da superfamília TNF de moléculas, interferon (tanto nas formas alfa quanto beta), talidomida, derivados de talidomida tais como lenalidomida, melfalan, e inibidores de

PARP. Outros exemplos específicos de agentes quimioterapêuticos adequados incluem mostardas nitrogenadas tais como ciclofosfamida, sulfonatos e alquila, nitrosouréias, etileniminas, triazenos, antagonistas de foliato, análogos de purina, análogos de pirimidina, antraciclina, bleomicinas, mitomicinas, dactinomicinas, plicamicina, vinca alcalóides, epipodofilotoxinas, taxanos, glicocorticóides, L-asparaginase, estrogênios, androgênios, progestinas, hormônios de luteinizante, acetato de octreotida, hidroxiuréia, procarbazona, mitotano, hexametilmelamina, carboplatina, mitoxantrona, anticorpos monoclonais, levamisol, interferons, interleucinas, filgrastim e sargramostim.

Outra forma de realização da presente invenção diz respeito ao uso do composto ou de uma composição da presente invenção em combinação com os inibidores de topoisomerase para potencializar seu efeito apoptótico de indução. Os inibidores de topoisomerase inibem a reprodução e reparo de DNA, promovendo deste modo a apoptose e são usados como agentes quimioterapêuticos. Os inibidores de topoisomerase promovem o dano de DNA inibindo-se as enzimas que são necessárias no processo de reparo do DNA. Portanto, a exportação do Smac da mitocôndria no citossol celular é provocada pelo dano do DNA causado pelos inibidores de topoisomerase. Os inibidores de topoisomerase tanto da classe Tipo I (camptotecina, topotecano, SN-38 (metabólito ativo de irinotecano) quanto da classe Tipo II (etoposida) são esperados mostrar sinergia potente com os compostos da presente invenção. Outros exemplos dos agentes que inibem a topoisomerase que podem ser usados incluem, mas não são limitados a, irinotecano, topotecano, etoposida, ansacrina, exatecano, gimatecano, etc. Outros inibidores de topoisomerase incluem, por exemplo, aclacinomicina A, camptotecina, daunorrubicina, doxorubicina, elipticina, epirubicina, e mitoxantrona.

Outra forma de realização da presente invenção diz respeito ao

uso do composto ou de uma composição da presente invenção em combinação com os medicamentos antiinflamatórios não esteroidais (NSAIDs).

Em uma outra forma de realização da invenção, o agente quimioterapêutico/antineoplástico para o uso em combinação com o composto e composições da presente invenção pode ser um composto contendo platina. Em uma forma de realização da invenção, o composto contendo platina é cisplatina. A cisplatina pode sinergizar com um composto da presente invenção e potencializar a inibição de um IAP, tal como mas não limitando a XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. Em uma outra forma de realização composto contendo um platina é carboplatina. A carboplatina pode sinergizar com um composto da presente invenção e potencializar a inibição de um IAP, incluindo, mas não limitando a, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc. Em uma outra forma de realização, um composto contendo platina é oxaliplatina. A oxaliplatina pode sinergizar com um composto da presente invenção e potencializar a inibição de um IAP, incluindo, mas não limitando a, XIAP, cIAP-1, c-IAP-2, ML-IAP, etc.

Os medicamentos de quimioterapia de platina pertencem a um grupo geral de agentes modificadores de DNA. Os agentes modificadores de DNA podem ser qualquer composto químico altamente reativo que liga com vários grupos nucleofílicos em ácidos nucleicos e proteínas e causam efeitos mutagênicos, carcinogênicos, ou citotóxicos. Os agentes modificadores de DNA trabalham em mecanismos diferentes, rompimento da função do DNA e morte da célula; dano DNA/formação de pontes ou ligações cruzadas entre os átomos no DNA; e indução de mal emparelhamento dos nucleotídeos levando à mutações, para obter o mesmo resultado final. Os exemplos não limitantes dos agentes modificadores de DNA contendo platina são cisplatina, carboplatina e oxaliplatina.

Ainda uma forma de realização da presente invenção é a

combinação terapêutica ou o uso terapêutico em combinação do composto ou composições da presente invenção com anticorpos de TRAIL ou agonistas de TRAIL, ou outros agentes químicos ou biológicos que ligam a e ativam os receptores de TRAIL. Muitos tipos de células cancerígenas são sensíveis à apoptose induzida por TRAIL, enquanto a maioria das células normais parecem resistir a esta ação de TRAIL. As células resistentes a TRAIL podem surgir através de uma variedade de diferentes mecanismos incluindo a perda do receptor, presença de receptores chamarriz, supraexpressão de FLIP que completa para a ligação de zimógeno caspa se-8 durante a formação de DISC e inibição da caspa se-3 e/ou caspa se-9 ativadas por XIAP. Na resistência de TRAIL, um composto ou composição da presente invenção pode aumentar a sensibilidade da célula tumoral a TRAIL levando a morte celular aumentada, as correlações clínicas as quais são esperadas ser de atividade apoptótica aumentada em tumores resistentes a TRAIL, resposta clínica melhorada, duração de resposta aumentada, e por ultimo, taxa de sobrevivência do paciente aumentada.

Em uma outra forma de realização da invenção, o Composto 15 é administrado em combinação com um citocina, por exemplo, $TNF\alpha$.

O composto e as composições da presente invenção também podem ser usados para aumentar a terapia de radiação (ou radioterapia), isto é, o uso médico da radiação de ionização como parte do tratamento do câncer para controlar as células malignas. Embora a radioterapia seja muitas vezes usada como parte da terapia de cura, esta é ocasionalmente usada como um tratamento paliativo, onde a cura não é possível e a ajuda é para o alívio sintomático. A radioterapia é comumente usada para o tratamento de tumores. Esta pode ser usada como a terapia primária. Também é comum combinar radioterapia com cirurgia e/ou quimioterapia. Os tumores mais comuns tratados com radioterapia são câncer de mama, câncer de próstata, câncer retal, cânceres de cabeça e pescoço, tumores ginecológicos, câncer de bexiga

e linfoma. A terapia de radiação é comumente aplicada à área localizada envolvida com o tumor. Frequentemente os campos radiação também incluem os linfônodos de drenagem. É possível, porém incomum fornecer radioterapia para o corpo todo, ou para a superfície inteira da pele. A terapia de radiação é geralmente fornecida diariamente até de 35 a 38 frações (uma dose diária é uma fração). Estas pequenas doses frequentes dão tempo para que as células saudáveis cresçam novamente, reparando o dano infligido pela radiação. Três divisões principais da radioterapia são radioterapia de feixe externo ou teleterapia, braquiterapia ou radioterapia de fonte lacrada e radioterapia de fonte não lacrada, que são todas exemplos adequados de protocolos de tratamento na presente invenção. As diferenças dizem respeito à posição da fonte de radiação; a externa é fora do corpo, enquanto a radioterapia de fonte lacrada e não lacrada tem um material radioativo internamente liberado. As fontes lacradas de braquiterapia são, em geral, extraídas posteriormente, enquanto as fontes não lacradas são injetadas no corpo.

O Composto 15 é capaz de formar sais farmacologicamente aceitáveis, incluindo mas não limitando aos sais de adição de ácido e/ou sais de adição de base. Tais sais estão incluídos dentro de todos aspectos da invenção.

É intencionado que a presente invenção inclua o Composto 15 sintetizado *in vitro* usando técnicas laboratoriais, tais como aquelas bem conhecidas aos químicos sintéticos; ou técnicas de sintetização *in vivo*, tal como através do metabolismo, fermentação, digestão, e outros. Também é considerado que o composto da presente invenção possa ser sintetizado usando uma combinação de técnicas *in vitro* e *in vivo*.

A presente invenção também inclui os compostos enriquecidos de maneira isotópica, que são idênticos ao Composto 15 mas para o fato de que um ou mais átomos são substituídos por um átomo tendo um número de massa ou massa atômica diferente da massa atômica ou número de massa

geralmente encontrados na natureza. Os exemplos de isótopos que podem ser incluídos na invenção incluem os isótopos de hidrogênio, carbono, nitrogênio, oxigênio, fósforo, flúor e cloro, tal como ^2H , ^3H , ^{13}C , ^{14}C , ^{15}N , ^{16}O , ^{17}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , e ^{36}Cl . A substituição com isótopos mais pesados tais como deutério, isto é, ^2H , também são incluídos. Os compostos isotopicamente enriquecidos desta invenção podem ser geralmente preparados substituindo-se um reagente isotopicamente rotulado prontamente disponível para um reagente não isotopicamente enriquecido. Por exemplo, a incorporação de deutério pode ser efetuada substituindo-se boroidreto de sódio com d4-boroidreto de sódio, ou através da substituição de iodometano com d3-iodometano. Os exemplos representativos dos análogos deuterados específicos e sua preparação são descritos no Exemplo 1.

O composto 15 pode existir em formas não solvatadas assim como formas solvatadas, incluindo formas hidratadas. Além disso, o Composto 15 pode existir em vários estados sólidos incluindo formas cristalinas, semicristalinas e amorfas (não cristalinas), e na forma de clatratos, pró-medicamentos, polimorfos, ésteres bio-hidrolizáveis, misturas racêmicas, misturas não racêmicas, ou como estereoisômeros purificados incluindo, mas não limitando a, enantiômeros e diastereômeros opticamente puros. Em geral, todas estas e outras tais formas são intencionadas ser abrangidas pelo escopo do termo Composto 15.

As referências ao Composto 15 e ao composto da invenção, e outras frases similares neste relatório descritivo e nas reivindicações, são intencionadas incluir não somente o composto da fórmula (I), mas também os sais farmacologicamente aceitáveis do Composto 15, assim como as várias formas do dito composto ou sais destes tais como aqueles que são descritos acima e abaixo.

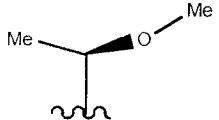
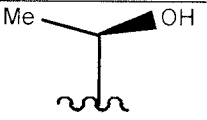
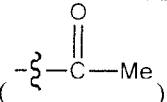
Nas formas de realização adicionais, a invenção compreende os compostos úteis como intermediários na síntese do Composto 15, assim


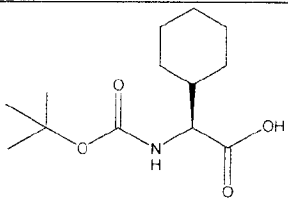
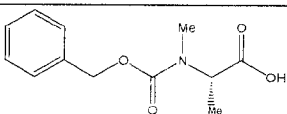
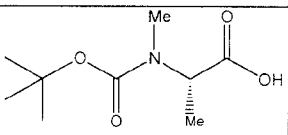
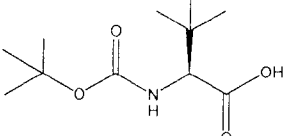
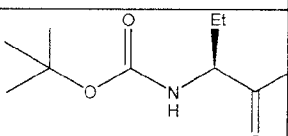
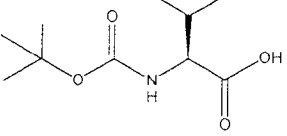
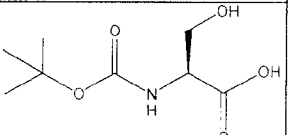
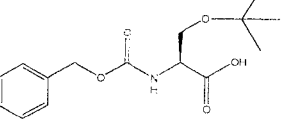
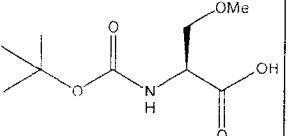
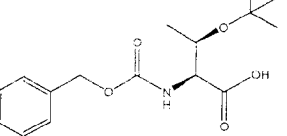
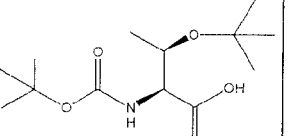
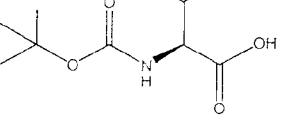
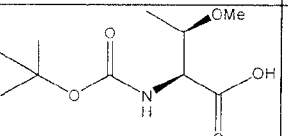
como nos processos para preparar tais intermediários e Composto 15. Por exemplo, em tais formas de realização, a invenção compreende os compostos apresentados nos Exemplos, abaixo, tais como Compostos 9, 10, 11, 12, 13, 14, e os compostos isotopicamente enriquecidos tais como os Compostos 18 até o 32. Uma tal forma de realização é o Composto 15 em que o substituinte 4-OH na porção de pirrolidino é protegido com um grupo de proteção. Um grupo de proteção ilustrativo é um grupo acetila, que é ilustrado nos Compostos 11 a 14, abaixo. Outros grupos de proteção serão evidentes ao técnico habilitado na técnica e incluem, por exemplo, os grupos benzoíla, benzila, trimetilsilila, e trifenilmetila. O grupo de proteção é removido, por exemplo, comunicando-se o intermediário protegido com um ácido ou uma base, como apresentado nos esquemas de XIII e XIV, abaixo. Deste modo, a invenção compreende o composto tendo a estrutura de Composto 15 assim como versões protegidas de Composto 15 tais como os Compostos 13 e 14 em que o terminal N são protegidos com porções de carbamato e/ou os grupos hidroxila livres são protegidos como ésteres, tais compostos sendo indicados como Composto Protegido 15. A invenção também compreende a etapa de desproteger um Composto Protegido 15 comunicando-se o Composto Protegido 15 com um ácido ou base por meio do qual o Grupo de Proteção é removido para produzir o Composto 15. Os compostos da invenção isotopicamente enriquecidos incluem as formas deuteradas do Composto 15 tais como Compostos 20, 29, e 32. As formas protegidas de tais compostos, por exemplo, Compostos 19, 28, e 31, também são compreendidas dentro da invenção.

25 Exemplos

As seguintes preparações e esquemas são ilustrativas das síntese de Compostos da presente invenção. As abreviações que são usadas por todo estes esquemas e na aplicação são geralmente identificadas na seguinte tabela:

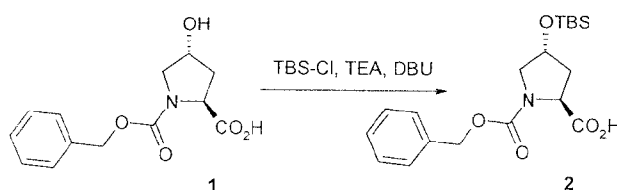
ABREVIACÃO	SIGNIFICADO	ABREVIACÃO	SIGNIFICADO
------------	-------------	------------	-------------

ACN	Acetonitrila	NMP	N-metilpirrolidinona
Ac ₂ O	Anidrido acético	PhCOCl	Cloreto de benzoíla
Cbz e Z	Benziloxicarbonila	DIAD	dicarboxilato de diisopropila azo
Boc e/ou boc	terc-butiloxicarbonila	DIBAL	Hidreto de diisobutil-alumínio
THF	Tetraidrofurano	DMAP	4-dimetilamino piridina
DCM	Diclorometano	DMF	Dimetilformamida
DDQ	2,3-dicloro-5,6-diciano- 1,4-benzoquinona	DMSO	Sulfóxido de dimetila
mCPBA	Ácido 3- cloroperbenzóico	TFA	Ácido trifluoroacético
Cbz-Cl	Cloreto de benziloxicarbonila	TFAA	Anidrido trifluoroacético
Hex	Hexanos	HOAc ou AcOH	Ácido acético
HPLC	cromatografia líquida de alto desempenho	DIPEA	Diisopropiletilamina
TLC	cromatografia de camada fina	NMM	N-metilmorfolina
EtOAc	acetato de etila	NCS	N-clorossuccinimida
Ph	Fenila	TEA (Et ₃ N)	Trietilamina
HATU	Hexafluorofosfato de 2- (7-aza-1H-benzotriazol- 1-il)-1,1,3,3- tetrametilurônio	MsCl	Metano-cloreto de sulfonila
Me	Metila*	Et	Etila
IPr	Iso-propila	tBu ou terc-Bu	terc-butila
cPr	Ciclopropila	cHex	Cicloexila
(2R-EtOMe) e/ou R-MeCHOMe		(2R-EtOH) e/ou R-MeCHOH	
TBAF	fluoreto de tetrabutil amônio	MsCl	Cloreto de metanossulfonila
OMs	Metanossulfonilóxi	OTs	-O-SO ₂ -Ph-Me
TBDMSCl ou TBSCl	cloreto de terc-butil- dimetil-silila	OTBS	terc-butil-dimetil-silanilóxi
Ph ₃ P	Trifenilfosfina	Ac	
n-Bu	Butila Normal	DMA	Dimetilamina
Swern[O]	Oxidação Swern	HWE	Reação de Honer-Wadsworth- Emmons
TBA-Cl	Cloreto de tetra-n-butil amônio	DMS	Sulfeto de dimetila
NP-HPLC	Cromatografia líquida de alto desempenho de fase normal	Ácido de Meldrum	2,2-dimetil-1,3-dioxano-4,6- diona
EDCI	Cloridreto de N-3-(di- metilamino-propil)-N'- etilcarbodiimida 1-etil-3-(3-dimetilamino- propil)-carbodiimida-HCl	Imid.	Imidazol

Et ₂ O	Óxido de etileno ()	HOBT, ou HBT	Hidroxibenzotriazol
TES	Trietilsilano	RT	temperatura ambiente
MeNO ₂	Nitrometano	MeOH	Metanol
EtOH	Etanol	NaOAc	Acetato de sódio
DCE, ou EDC	Dicloroetano, dicloreto de etileno	ClCO ₂ Me	Cloroformiato de etila
NaHMDS	Hexametildisilazida de sódio ou bis(trimetilsilil)-amida de sódio	TBSCl	Cloreto de terc-butil-dimetil-silanil
Boc-Chg-OH (Boc-L-ciclo-exilglicina)		Cbz-N(Me)Ala-OH Z-N(Me)Ala-OH	
Boc-N(Me)Ala-OH		Boc-Tle-OH	
Boc-Abu-OH		Boc-Val-OH	
Boc-Ser-OH		Cbz-Ser(tBu)-OH	
Boc-Ser(Me)-OH		Cbz-Thr(tBu)-OH	
Boc-Thr(tBu)-OH		Boc-Thr-OH	
Boc-Thr(Me)-OH		PSI	Libras por polegada quadrada (Manométrico)
h	Hora	NaOMe	Metóxido de sódio

Exemplo 1 - Síntese

Esquema I



Éster 1-benzílico do ácido 4-(terc-butil-dimetil-silanilóxi)-

pirrolidino-1,2-dicarboxílico (2) : Uma solução de Z-Hyp-OH (1, 300 g, 1,13 mol), TEA (395 ml, 2,83 mol), e DBU (17,2 g, 1,13 mol) em DMF (1,25 litro)

foi agitada em um banho de água fria enquanto uma suspensão de TBS-Cl (188 g, 1,24 mol) em DMF (270 ml) foi adicionada lentamente de 21 a 26° C

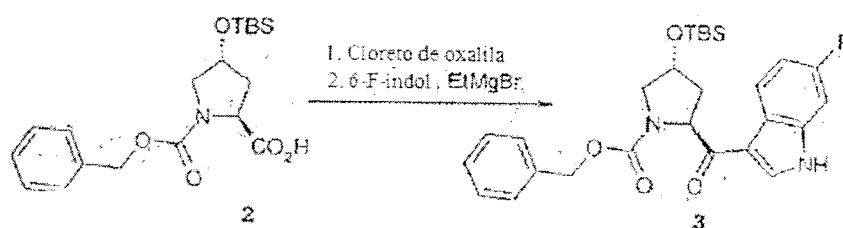
[Nota: moderadamente exotérmico]. A suspensão fina resultante foi agitada por 22 h na temperatura ambiente. A mistura da reação foi esfriada até 2° C e extinta com água (1,54 litro) a $\leq 26^\circ \text{C}$ [Nota: o pH da camada aquosa foi de 8,5 a 9,0]. O MTBE (3 litros) foi adicionado e a mistura foi acidificada até o

pH 3 a 4 com HCl conc. (168 g) de 17 a 19° C. A camada orgânica foi separada e lavada com a água (2 \times 1,5 litro). A camada orgânica foi concentrada a vácuo e secada pela destilação de MTBE adicional. O tolueno (2 \times 500 ml) foi adicionado e destilado para remover a umidade para fornecer

603 g de 2 como um óleo de cor amarelo claro [Nota: o conteúdo de água pela análise de KF foi 508 ppm]. Com base na secagem uma amostra pequena de 2 até um sólido, o peso contido de 2 foi de 412 g (96 % de rendimento, não corrigido quando a pureza). ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) : δ 7,34 (m, 3H), 7,29 (m, 2 H), 5,24 - 5,11 (m, 2 H), 4,52 (m, 1 H), 4,43 (m, 1 H), 3,64 - 3,42 (m, 2 H), 2,27 - 2,09 (m, 2 H), 0,85 (s, 9H), 0,06 (s, 3H), 0,04 (s, 3H) ppm;

^{13}C RMN (75 MHz, d_6 -DMSO), mistura de rotâmeros: δ 178,7, 178,4, 159,3, 158,9, 141,9, 141,8, 133,4, 133,3, 132,8, 132,6, 132,3, 131,9, 75,3, 74,6, 71,0, 71,0, 62,8, 62,3, 60,1, 59,7, 44,4, 43,4, 30,6, 30,6, 22,6, 22,6, 0,1, 0,0 ppm.

Espectro de massa (ESI), m/z 379,5 [(M) $^+$; calculado para $\text{C}_{19}\text{H}_{29}\text{NO}_5\text{Si}$: 379,5].



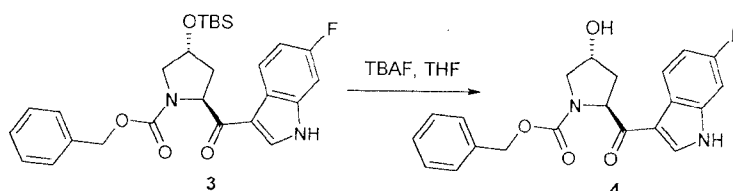
Éster benzílico do ácido 4-(terc-butil-dimetil-silanilóxi)-2-(6-
fluoro-1H-indol-3-carbonil)-pirrolidino-1-carboxílico (3) : Z-Hyp(OTBS)-OH

(2, 55,5 g, 145 mmol) foi dissolvido em tolueno (265 ml). O DMF (0,1 ml) e o cloreto de oxalila (22,4 g, 174 mmol) foram adicionados na temperatura ambiente. Depois de 2 a 3 h, a ebulição parou. Depois de 4 h, a mistura foi concentrada a vácuo (banho a 65° C, cerca de 30 min) para fornecer 95 g de uma solução de cor amarela clara que foi confirmada ser cloreto ácido pela análise de ¹H RMN.

O 6-fluoroindol (39,2 g, 290 mmol) foi dissolvido em clorobenzeno anidro (300 ml) e o tolueno (200 ml) e a solução foi esfriada até -4° C usando um banho de gelo/acetona. Uma solução de EtMgBr 3 M em éter dietílico (101 g, 294 mmol) foi adicionada em 31 minutos a ≤ 2,5° C resultando em uma solução de cor âmbar claro. Depois de 30 min, a solução de cloreto ácido/tolueno (veja acima) foi adicionada em 45 minutos a < 2° C. A mistura da reação foi mantida fria por 1 h depois deixada lentamente aquecer. Depois de cerca de 4 h (10,6° C), a mistura da reação foi extinta com HOAc glacial (9,0 g, exotérmica para 17,5° C) e depois água (exotérmica). A água (200 ml) e EtOAc (300 ml) foram adicionados e a camada orgânica foi separada e lavada com a água (100 ml, separação lenta). A camada orgânica foi concentrada a vácuo para produzir 227 g de 3 como um óleo de cor âmbar que foi usado sem outra purificação. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), ~ mistura de rotâmeros 2:1: δ 9,38 (m, 0,7H), 8,58 (m, 0,3H), 8,35 (app. dd, J = 5,2, 8,2 Hz, 0,3H), 8,03 (app. dd, J = 5,2, 8,2 Hz, 0,7H), 7,74 (d, J = 2,9 Hz, 0,7H), 7,66 (d, J = 2,9 Hz, 0,3H), 7,38 - 7,32 (m, 5H), 7,07 (m, 1 H), 6,95 (m, 1 H), 6,85 (m, 1 H), 5,26 - 4,92 (m, 3H), 4,54 (m, 1 H), 3,80 (app. dt, J = 5,2, 11,1

Hz, 1 H), 3,61 (app. d, $J = 11,1$ Hz, 0,3H), 3,55 (app. d, $J = 11,1$ Hz, 0,7H), 2,25 - 2,07 (m, 2 H), 0,88 (s, 9H), 0,06 (s, 3H), 0,00 (s, 3H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, d_6 -DMSO), mistura de rotâmeros: δ 193,4, 193,0, 159,3 (d, $J_{\text{CF}} = 235,5$ Hz), 153,9 (d, $J_{\text{CF}} = 16,2$ Hz), 136,7, 136,8 (d, $J_{\text{CF}} = 34,0$ Hz), 134,6, 128,3, 127,8, 127,2, 126,6, 122,4, 113,7 (d, $J_{\text{CF}} = 13,5$ Hz), 110,2 (d, $J_{\text{CF}} = 20,2$ Hz), 98,5 (d, $J_{\text{CF}} = 25,4$ Hz), 70,6, 69,8, 65,8, 65,8, 60,6, 60,3, 55,5, 55,0, 25,7, 25,6, 17,7, 17,7, -4,8, -4,9 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 518,9 $[[\text{M} - \text{H}] + \text{Na}]^+$; calculado para $\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{FN}_2\text{O}_4\text{SiNa}$: 518,6].

Esquema III



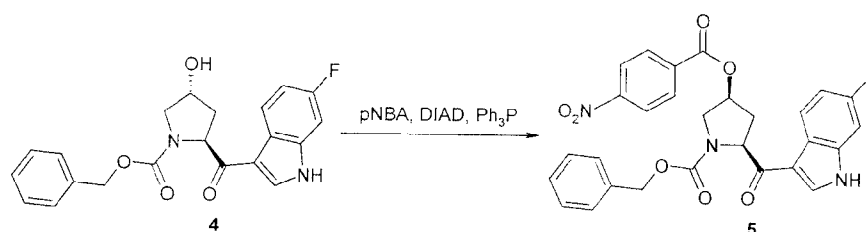
10 Éster benzílico do ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-hidróxi-pirrolidino -1-carboxílico (4): A uma solução contendo 3 (227 g) em THF (600 ml) foi adicionado TBAF 1 M em THF (160 ml) na temperatura ambiente. Depois de 9 h, mais 20 ml da solução de TBAF 1 M/THF foi adicionada. Depois de cerca de 48 h, a mistura da reação foi concentrada a vácuo e depois redissolvida em EtOAc (600 ml). A solução orgânica foi lavada com a água (310 ml) e o produto precipitou para formar uma suspensão espessa que foi filtrada (lenta). Os sólidos foram lavados com EtOAc (165 ml em porções) e secados para fornecer 43 g do 4. O filtrado combinado foi concentrado a vácuo para precipitar um adicional 4,8 g do 4

20 depois da secagem. ^1H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO), mistura de rotâmeros: δ 12,08 (br s, 1 H), 8,43 (d, $J = 10,5$ Hz, 1 H), 8,16 (ddd, $J = 5,4, 8,7, 14,1$ Hz, 1 H), 7,36 - 7,31 (m, 2 H), 7,27 (app. d, $J = 10,2$ Hz, 1 H), 7,09 - 6,93 (m, 4H), 5,24 (dt, $J = 8,1, 15,6$ Hz, 1 H), 5,14 (br s, 1 H), 5,04 (app. d, $J = 6,4$ Hz, 1 H), 4,90 (app. dd, $J = 13,4, 28,4$ Hz, 1 H), 4,30 (br s, 1 H), 3,58 - 3,43 (m, 2 H), 2,27 (m, 1 H), 1,93 (m, 1 H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, d_6 -DMSO), mistura de rotâmeros: δ 194,0, 193,6, 159,9 (d, $J_{\text{CF}} = 235,2$ Hz), 154,6 (d, $J_{\text{CF}} = 9,6$ Hz),

25

138,1. 137,5 (d, $J_{CF} = 26,9$ Hz), 136,0, 129,0, 128,5, 128,1 (d, $J_{CF} = 40,0$ Hz), 123,4, 123,3, 123,0, 122,9, 114,4 (d, $J_{CF} = 11,7$ Hz), 110,6 (d, $J_{CF} = 23,7$ Hz), 99,3 (d, $J_{CF} = 25,2$ Hz), 69,5, 68,8, 66,4, 66,3, 61,4, 61,1, 56,2, 55,7 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 382,6 [(M)⁺; calculado para C₂₁H₁₉FN₂O₄: 382,3].

Esquema IV



Éster benzílico do ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-

(4-nitro-benzoilóxi)-pirrolidino-1-carboxílico (5) : Uma solução contendo 4

(51,1 g, 134 mmol), ácido 4-nitrobenzóico (27,9 g, 167 mmol) e

10 trifenilfosfina (48,9 g, 187 mmol) em THF anidro (700 ml) e DMF (175 ml)

foi esfriado até 2° C. O DIAD (37,4 ml, 194 mmol) foi adicionado em 1 h de

2 a 3° C. Depois de 1 h, a solução foi deixada aquecer até a temperatura

ambiente. Depois de cerca de 16 h, a mistura da reação foi concentrada a

vácuo e MeOH (250 ml) foi adicionado e concentrado para formar uma

15 suspensão espessa (322 g). O MeOH adicional (250 ml) foi adicionado e a

solução foi concentrada a vácuo para produzir uma suspensão espessa (420 g)

que foi esfriada em um banho de gelo. Depois cerca de 1,5 h, o sólido foi

coletado em um filtro a vácuo e lavado com o MeOH esfriado (190 ml). O

produto foi secado ao ar no filtro para fornecer 82,9 g (> 100 %) do 5 como

20 um sólido de cor amarelo claro que foi usado diretamente na reação seguinte.

¹H RMN (300 MHz, d₆-DMSO), mistura de rotâmeros: δ 12,14 (br s, 1 H),

8,47 (app. d, J = 6,6 Hz, 1 H), 8,29 - 8,21 (m, 3H), 8,03 (dd, J = 2,7, 8,4 Hz, 2

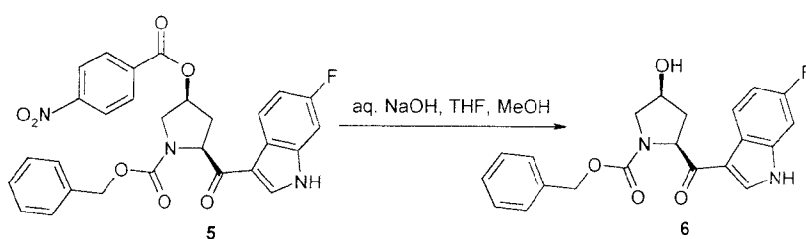
H), 7,43 - 7,33 (m, 2 H), 7,28 (app. dd, J = 2,1, 9,6 Hz, 1 H), 7,20 - 7,08 (m,

4H), 5,55 (br s, 1 H), 5,42 (dd, J = 8,4, 15,3 Hz, 1 H), 5,13 (dd, J = 12,6, 22,2

25 Hz, 1 H), 5,04 (s, 1 H), 3,99 (m, 1 H), 3,73 (d, J = 12,3 Hz, 1 H), 2,91 (m, 1

H), 2,36 (m, 1 H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$), mistura de rotâmeros: δ 192,9, 192,4, 164,2, 160,0 (d, $J_{\text{CF}} = 235,5$ Hz), 154,5 (d, $J_{\text{CF}} = 12,0$ Hz), 150,9, 137,5, 137,1 (d, $J_{\text{CF}} = 12,6$ Hz), 135,6, 135,1, 131,3, 128,9 (d, $J_{\text{CF}} = 28,0$ Hz), 128,5, 128,2, 128,1, 127,6, 124,2, 123,0, 113,5 (d, $J_{\text{CF}} = 8,5$ Hz), 110,9 (d, $J_{\text{CF}} = 21,9$ Hz), 99,1 (d, $J_{\text{CF}} = 25,5$ Hz), 75,2, 74,3, 66,7, 66,5, 62,4, 62,1, 53,6, 53,0, 38,6, 37,6 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 531,8 [(M)+; calculado para $\text{C}_{28}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_7$: 531,5].

Esquema GELO

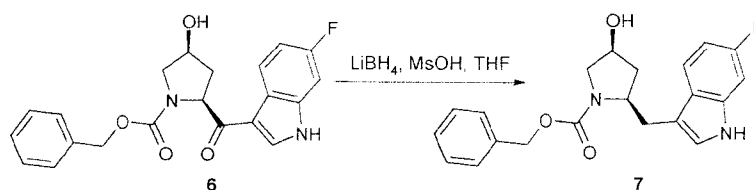


Éster benzílico do ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-carbonil)-4-

10 hidróxi-pirrolidino-1-carboxílico (6) : A uma suspensão de 5 (82,9 g) em THF (600 ml), MeOH (200 ml), e água (100 ml) foram adicionados 50 % de NaOH aq. (16,0 g, 200 mmol) [Nota: exotérmica; aumento de temp.: 23,7° C a 25,9° C]. Depois de 2 h, HOAc glacial (5,3 g) foi adicionado para ajustar o pH até 7 a 8 [Nota: a solução de cor laranja mudou para amarelo claro] e a mistura da
15 reação foi concentrada a vácuo. A água (500 ml) foi adicionada e o solvente foi removido a vácuo até que uma suspensão espessa formou-se. O sólido foi coletado em um filtro a vácuo e lavado com a água (400 ml em porções). O sólido foi secado em uma estufa a vácuo a 55° C para produzir 42,6 g (83 %, 2 etapas) do 6 como um sólido branco amarelado. ^1H RMN (300 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) : δ 8,38 (d, $J = 11,1$ Hz, 1 H), 8,14 (ddd, $J = 5,7, 8,7, 14,1$ Hz, 1 H), 7,35 - 7,29 (m, 2 H), 7,25 (app. dd, $J = 2,1, 9,9$ Hz, 1 H), 7,10 - 6,95 (m, 4H), 5,16 - 4,98 (m, 2 H), 4,90 (app. q, $J = 13,5, 25,8$ Hz, 1 H), 4,26 (m, 1 H), 3,74 (app. ddd, $J = 6,3, 11,1, 18,3$ Hz, 1 H), 3,22 (m, 1 H), 2,59 (m, 1 H), 1,73 (app. ddd, $J = 6,6, 12,9, 25,2$ Hz, 1 H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, $\text{d}_6\text{-DMSO}$) :
20 δ 193,8, 193,3, 160,0 (d, $J_{\text{CF}} = 235,2$ Hz), 154,4 (d, $J_{\text{CF}} = 14,5$ Hz), 137,5 (d,
25

$J_{CF} = 26,0$ Hz), 137,2 (d, $J_{CF} = 12,3$ Hz), 129,0, 128,5, 128,2 (d, $J_{CF} = 35,4$ Hz), 128,1, 127,4, 123,2, 123,1, 114,4 (d, $J_{CF} = 11,4$ Hz), 110,8 (d, $J_{CF} = 23,7$ Hz), 110,8 (d, $J_{CF} = 23,7$ Hz), 99,0 (d, $J_{CF} = 25,8$ Hz), 69,4, 68,6, 66,5, 66,4, 61,5, 61,2, 54,9, 54,6 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 383,8 [(M + H)⁺];
 5 calculado para $C_{21}H_{20}FN_2O_4$: 383,3].

Esquema VI



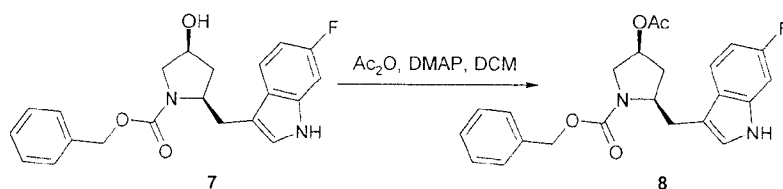
Éster benzílico do ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-ilmetil)-4-hidróxi-pirrolidino-1-carboxílico (7) : A uma suspensão do 6 (10,1 g, 26 mmol) em THF anidro (200 ml) foi adicionado $LiBH_4$ 2 M em THF (26,2 ml, 52 mmol) em cerca de 7 min [Nota: exotérmica; aumento de temp.: 21,5° C a 28,2° C]. Depois de 2,5 h, a solução de cor amarela clara foi esfriada até cerca de 11° C e o ácido metanossulfônico (4,66 g, 48 mmol) foi adicionado em cerca de 4 min [Nota: exotérmica; aumento de temp. até 14,2° C].

15 Depois de 16 h, a mistura da reação foi esfriada em um banho de gelo e cuidadosamente extinta com água (50 ml) [Nota: a adição de água foi exotérmica e liberada em uma grande quantidade de gás]. A seguir da adição de água, o pH foi ajustado até 1 com HCl conc. (1,9 g). A mistura da reação foi concentrada para remover o THF e a solução aquosa foi extraída com EtOAc (110 ml). A camada orgânica foi separada e lavada com a água (2
 20 × 50 ml) [Nota: final pH cerca de 5]. A solução orgânica foi concentrada a vácuo e azeotropicamente secada usando EtOAc anidro para fornecer 10,2 g do 7 como uma espuma branca [Nota: 87,7 A % pela análise de HPLC]. ¹H RMN (300 MHz, d_6 -DMSO), ~ mistura de rotâmeros 1:1: δ 10,91 (app. d, $J = 5,4$ Hz, 1 H), 7,69 (dd, $J = 6,0, 8,4$ Hz, 0,5H), 7,48 - 7,30 (m, 4,5H), 7,13 - 7,07 (m, 3H), 6,85 (app. t, $J = 8,4$ Hz, 0,5H), 6,58 (app. t, $J = 9,9$ Hz, 0,5H),
 25 5,19 - 5,10 (m, 3H), 4,25 (br s, 1 H), 4,03 - 3,96 (m, 1 H), 3,55 (dd, $J = 5,1,$

11,4 Hz, 1 H), 3,29 (d, $J = 11,4$ Hz, 1 H), 3,17 - 2,98 (m, 2 H), 1,79 (m, 2 H) ppm. ^{13}C RMN (300 MHz, d_6 -DMSO), mistura de rotâmeros: δ 159,5 (d, $J_{\text{CF}} = 232,1$ Hz), 159,4 (d, $J_{\text{CF}} = 232,3$ Hz), 154,9, 137,7 (d, $J_{\text{CF}} = 36,6$ Hz), 136,7 (d, $J_{\text{CF}} = 12,6$ Hz), 136,6 (d, $J_{\text{CF}} = 12,9$ Hz), 129,1, 129,1, 128,7, 128,6 (d, $J_{\text{CF}} = 26,3$ Hz), 128,2, 125,0 (d, $J_{\text{CF}} = 21,4$ Hz), 124,5, 124,3, 120,1 (d, $J_{\text{CF}} = 28,3$ Hz), 120,0 (d, $J_{\text{CF}} = 28,6$ Hz), 112,4 (d, $J_{\text{CF}} = 14,6$ Hz), 107,4 (d, $J_{\text{CF}} = 24,3$ Hz), 107,3 (d, $J_{\text{CF}} = 24,3$ Hz), 69,9, 69,2, 67,1, 66,3, 58,7, 58,1, 56,1, 55,6, 38,3, 37,6, 31,2, 30,1 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 368,6 [(M)+; calculado para $\text{C}_{21}\text{H}_{21}\text{FN}_2\text{O}_3$: 368,4].

10

Esquema VII

Éster benzílico do ácido 4-Acetóxi-2-(6-fluoro-1H-indol-3-

ilmetil)-pirrolidino-1-carboxílico (8) : A uma solução contendo 7 (4,7 g, 12,8

mmol) e DMAP (81 mg, 0,66 mmol) em DCM (100 ml) foi adicionado anidrido acético (2,6 g, 25,5 mmol) na temperatura ambiente. Depois de 16 h,

15 a mistura da reação foi extinta com um MeOH (cerca de 3 ml) e lavado sucessivamente com 10 % de Na_2CO_3 aq. (50 ml), HCl diluído (50 ml), e 10

% de Na_2CO_3 aq. (50 ml). A solução orgânica foi concentrada a vácuo e filtrada através de uma coluna curta de gel de sílica (cerca de 25 g) [eluente:

DCM (200 ml) até 0,5 % (gelo/gelo) de MeOH/DCM (80 ml) até 2 % de

20 MeOH/DCM (100 ml) até 5 % de MeOH/DCM (100 ml)]. As frações que contêm o produto foram combinadas e concentradas para fornecer 3,28 g (63

%) do 8 como uma espuma branca [Nota: 94,3 A % pela análise de HPLC].

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), ~ mistura de rotâmeros 1:1: δ 7,99 (m, 1 H),

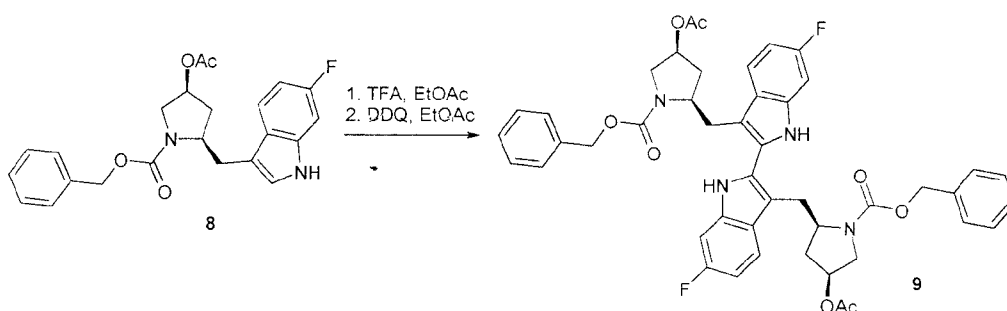
7,75 - 6,61 (m, 9H), 5,28 (m, 1 H), 5,20 (m, 2 H), 4,23 (m, 1 H), 3,82 (dt, $J =$

25 5,4, 13,5 Hz, 1 H), 3,60 (app. t, $J = 13,2$ Hz, 1 H), 3,50 (d, $J = 11,7$ Hz, 0,5H),

3,31 (d, $J = 12,9$ Hz, 0,5H), 2,87 (dt, $J = 5,1, 13,5$ Hz, 1 H), 2,13 (s, 3H), 2,01

(m, 2 H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3), ~ mistura de rotâmeros 1:1: δ 170,8, 160,2 ($J_{\text{CF}} = 236,4$ Hz), 155,2, 136,8, 136,6, 136,4, 128,9, 128,8, 128,5 ($J_{\text{CF}} = 24,3$ Hz), 124,5 ($J_{\text{CF}} = 21,4$ Hz), 123,0, 123,0, 120,0 ($J_{\text{CF}} = 27,1$ Hz), 119,9 ($J_{\text{CF}} = 26,0$ Hz), 112,8 ($J_{\text{CF}} = 10,5$ Hz), 108,2 ($J_{\text{CF}} = 24,3$ Hz), 97,7 ($J_{\text{CF}} = 25,7$ Hz), 74,0, 73,2, 67,9, 67,2, 58,5, 57,6, 53,4, 53,0, 35,4, 34,6, 30,8, 29,7, 21,5 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 410,6 [(M) $^+$]; calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{FN}_2\text{O}_4$: 410,4].

Esquema VIII



Éster benzílico do ácido 4-Acetóxi-2-[3'-(4-acetóxi-1-

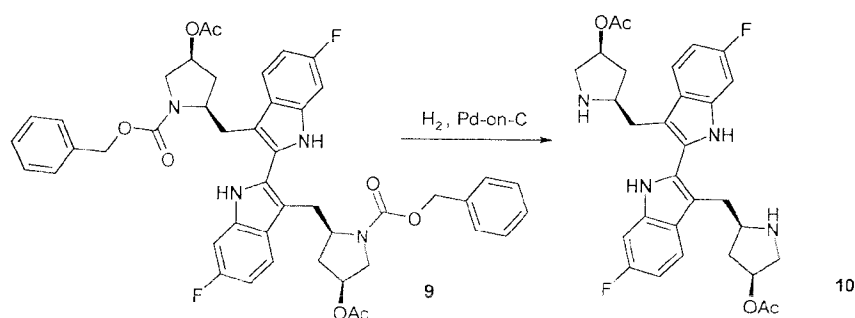
10 benziloxycarbonil-pirrolidin-2-ilmetil)-6,6'-difluoro-1H,1'-H-[2,2']biindolil-3-
ilmetil]-pirrolidino-1-carboxílico (9) : Uma solução contendo 8 (2,9 g, 7,1
 mmol) em EtOAc (cerca de 5 ml) foi esfriada em um banho de gelo e em TFA
 pré-esfriado (20,3 ml) foi adicionada em uma porção. A solução de cor
 amarela resultante foi agitada de 2 a 4° C. Depois de 4,75 h, a mistura da
 15 reação fria foi transferida (por intermédio de cânula) com agitação em uma
 mistura de EtOAc pré-esfriada (30 ml), e 25 % de K_2CO_3 aq. (80,7 g). A
 camada aquosa foi separada e extraída com EtOAc (3×30 ml) e os extratos
 orgânicos combinados foram lavados com 10 % de Na_2CO_3 aq. (30 g). A
 solução orgânica foi concentrada a vácuo e azeotropicamente secada usando
 20 EtOAc anidro para produzir 2,95 g de diastereômeros de indolilindolina como
 uma espuma de cor amarela que foi usada diretamente na reação seguinte.
 Espectro de massa (ESI), m/z 821,3 [(M) $^+$]; calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{46}\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$:
 820,9].

A uma solução contendo os diastereômeros de indolilindolina

(2,95 g) em EtOAc (30 ml) foi adicionado DDQ (885 mg, 3,9 mmol) em uma porção [Nota: exotérmica; aumento de temp.: 26° C a 31,6° C]. Depois de 3 h, a mistura de reação de cor laranja/marrom foi filtrada através de Celite[®] que foi subsequentemente enxaguada com EtOAc (50 ml). [Nota: uma segunda
5 reação realizada na escala de 0,5 mmol foi combinada para o trabalho]. O filtrado foi lavado com 10 % de Na₂CO₃ aq. (2 lavagens: 74 g, depois 58 g). A camada orgânica foi concentrada a vácuo para fornecer 2,14 g do 9 como um sólido de cor marrom clara.

A almofada de Celite[®] foi enxaguada ainda com THF (100 ml)
10 que foi concentrado a vácuo para fornecer mais 1,12 g do 9 como um sólido de cor bege clara. Os sólidos combinados foram dissolvidos em acetato de isopropila (iPrAc, 50 ml). A solução de iPrAc foi reduzida até cerca de 20 ml e a suspensão resultante foi aquecida ao refluxo, esfriada até a temperatura ambiente, e depois colocada em um banho de gelo. Depois de 1 h, o sólido foi
15 coletado pela filtração a vácuo, lavado com iPrAc (10 ml) e secado em uma estufa a vácuo para produzir 2,13 g (65 %, 2 etapas) do 9 como um sólido de cor bege clara [Nota: ~ 100 A % pela análise de HPLC]. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ 11,29 (br s, 2 H), 7,57 - 7,36 (m, 14H), 6,90 (app. dt, J = 2,1, 9,3 Hz, 2 H), 5,39 - 5,30 (m, 6H), 4,28 (t, J = 9,0 Hz, 2 H), 3,84 - 3,73 (m, 4H),
20 3,66 (d, J = 13,2 Hz, 2 H), 3,40 (dd, J = 12,0, 14,4 Hz, 2 H), 2,31 (s, 6H), 2,17 (m, 2 H), 2,05 (m, 2 H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) : δ 170,7, 161,9, 158,8, 156,3, 137,5, 137,3, 136,5, 128,9, 128,6, 128,5, 125,9, 118,8, 118,6, 108,8, 108,5, 108,3, 98,7, 98,3, 74,4, 68,0, 60,1, 53,5, 34,5, 28,9, 21,7 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 818,2 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₄₄F₂N₄O₈:
25 818,8].

Esquema IX



Éster 5-[3'-(4-acetóxi-pirrolidin-2-ilmetil)-6,6'-difluoro-

1H,1'H-[2,2'] biindolil -3-ilmetil]-pirrolidin-3-ílico do ácido acético (10) :

Uma suspensão contendo 9 (35 g, 42,7 mmol) em EtOAc 1:1 /MeOH (400 ml) foi distribuída em duas garrafas de Parr de 500 ml (cerca de 200 ml/cada),

5 e carregada com 10 % de Pd-em-C (umidade, 5000 mg/cada, Aldrich®). A mistura da reação foi pressurizada até 50 PSI (345 kPa) H₂ e agitada por 3 h.

A mistura da reação foi filtrada através de uma almofada de Celite® e os sólidos foram lavados com EtOAc. O filtrado clarificado foi concentrado a

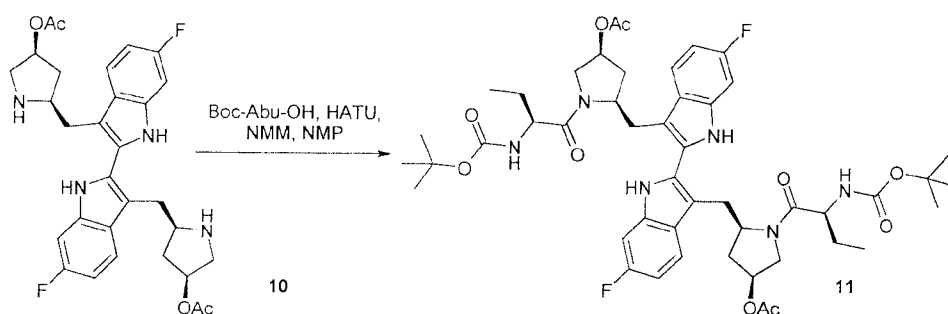
vácuo para produzir 24 g do 10 como um sólido branco amarelado que foi usado diretamente na reação seguinte. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ 13,10

(br s, 2 H) 7,45 (dd, J = 5,2, 8,9 Hz, 2 H), 7,03 (dd, J = 2,3, 9,8 Hz, 2 H), 6,85 (m, 2 H), 5,35 (m, 2 H), 3,71 (m, 2 H), 3,18 - 3,35 (m, 4H), 2,90 - 3,14 (m,

4H), 2,56 (m, 2 H), 2,00 - 2,10 (m, 2 H), 2,04 (s, 6H), 1,80 - 1,92 (m, 2 H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) : δ 171,3, 161,7, 158,6, 136,1, 135,9, 130,5,

15 130,4, 125,4, 119,1, 118,9, 109,6, 108,0, 107,6, 97,6, 97,5, 75,1, 57,7, 51,6, 38,7, 32,8, 21,6 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 550,9 [(M)⁺]; calculado para C₃₀H₃₂F₂N₄O₄: 550,6].

Esquema X

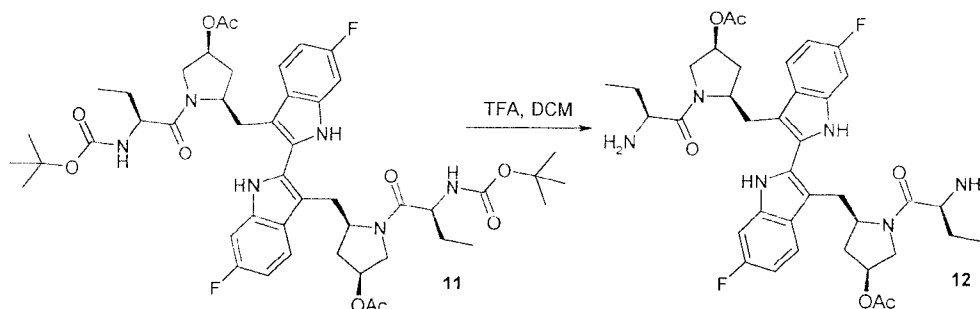


Éster do 5-{3'-[4-acetóxi-1-(2-terc-butoxicarbonilamino-

butiril)-pirrolidin-2-ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil}-1-(2-terc-butóxi-carbonilamino-butiril)-pirrolidin-3-ílico do ácido acético (11) :

A uma solução contendo Boc-Abu-OH (20,4 g, 100 mmol) e HATU (42,0 g, 110 mmol) em NMP anidro (150 ml) a 0° C foi adicionado NMM (16 ml, 150 mmol) seguido por uma solução do 10 (24 g, 42 mmol) em NMP (100 ml). A mistura da reação foi lentamente aquecida até a temperatura ambiente. Depois de 16 h, a mistura da reação foi diluída com MTBE (1000 ml) e a mistura heterogênea foi lavada com a água (500 ml). As camadas foram separadas e a fase orgânica formou uma suspensão heterogênea. O MTBE (1000 ml) e EtOAc (500 ml) foram adicionados e a solução agora homogênea foi lavada sucessivamente com HCl 1 N (2 × 100 ml), NaHCO₃ saturado aquoso (2 × 100 ml), salmoura, secado em Na₂SO₄ anidro, filtrado e concentrado. O resíduo foi dissolvido em DCM 1:1/ MeOH (600 ml) e DCM (cerca de 200 ml) foi removido por intermédio de destilação a 50° C [Nota: uma quantidade pequena de precipitado branco foi observado]. O MeOH (200 ml) foi adicionado e o solvente adicional foi removido (cerca de 200 ml) a 50° C. A mistura heterogênea foi esfriada a -5° C. Depois de 16 h, o sólido foi coletado pela filtração a vácuo e lavado com MeOH frio. O sólido foi secado sob alto vácuo para produzir 32 g do 11 como um sólido branco amarelado. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), mistura de rotâmeros: δ 11,22 (br s, 2 H), 7,40 (dd, J = 5,1, 8,7 Hz, 2 H), 7,31 (d, J = 9,3 Hz, 2 H), 6,76 (dd, J = 8,40, 8,40, 2 H) 6,26 (br s, 2 H), 5,44 (m, 2 H), 4,39 (dd, J = 7,5, 16,5 Hz, 2 H), 4,24 (m, 2 H), 4,15 (dd, J = 5,1, 12,9 Hz, 2 H), 3,79 (d, J = 12,9 Hz, 2 H), 3,10 - 3,30 (m, 4H), 2,32 (d, J = 14,7 Hz, 2 H), 2,24 (s, 6H), 1,90 (m, 2 H), 1,74 (m, 2 H), 1,56 (s, 18H), 0,99 (t, J = 7,5 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃) : δ 172,2, 170,4, 161,4, 158,3, 155,8, 137,0, 136,9, 128,6, 125,5, 118,9, 118,7, 108,6, 108,4, 108,1, 98,3, 98,0, 80,8, 74,7, 60,4, 53,8, 53,5, 34,1, 28,7, 28,6, 26,2, 21,5, 10,5 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 920,5 [(M)+; calculado para C₄₈H₆₂F₂N₆O₁₀: 921,0].

Esquema XI



Éster 5-{3'-[4-acetóxi-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-2-

ilmetil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil}-1-(2-amino-butiril)-

pirrolidin-3-ílico do ácido acético (12): Uma solução contendo 11 (27,5 g, 30

5 mmol) em DCM (200 ml) foi esfriada até 0° C. O TFA (50 ml) foi adicionado e a reação foi monitorada pela análise de LC/MS até a conversão completa do

11 a 12 (cerca de 3 h). O solvente foi removido a vácuo e o resíduo de cor verde escura foi dissolvido em EtOAc (cerca de 1 litro). A solução de EtOAc

foi cuidadosamente vertida em uma mistura de NaHCO₃ saturado aquoso /gelo/água para neutralizar o THF residual. A fase orgânica foi separada e

lavada duas vezes com NaHCO₃ saturado aquoso depois uma vez com salmoura. As lavagens aquosas combinadas foram retro-extraídas com EtOAc

(2 × 100 ml) e os extratos orgânicos combinados foram secados em Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados para produzir 22 g do 12 bruto como um

sólido branco amarelado. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH), mistura de rotâmeros: δ 11,62 (br s, 2 H), 7,48 - 7,62 (m, 4H), 6,89 (ddd, J = 2,4, 9,3,

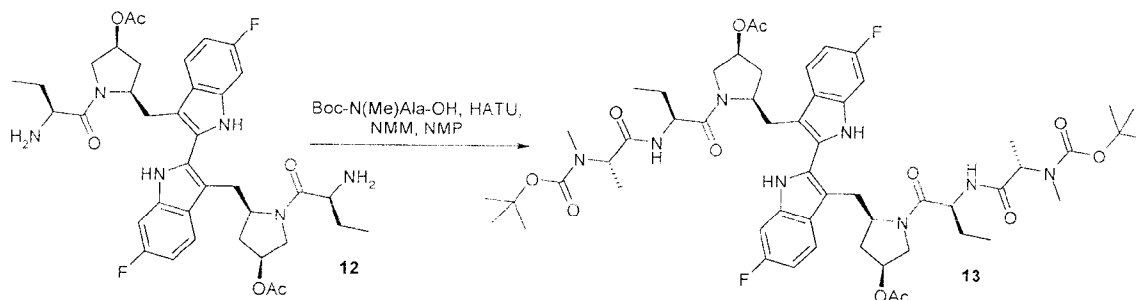
9,3 Hz, 2 H), 5,48 (dd, J = 4,5, 4,8 Hz, 2 H), 4,52 (dd, J = 9,3, 9,3 Hz, 2 H), 4,06 (dd, J = 4,8, 12,3 Hz, 2 H), 3,78 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 3,54 - 3,70 (m,

4H), 3,30 - 3,40 (m, 2 H), 2,33 (s, 6H), 2,02 2,16 (m, 2 H), 1,70 - 1,96 (m,

4H), 1,09 (t, J = 7,2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH) : δ 173,5, 170,9, 161,8, 158,6, 137,2, 137,1, 128,2, 128,1, 125,6, 118,7, 118,6,

108,6, 108,3, 108,0, 98,6, 98,1, 74,6, 60,1, 53,5, 33,5, 28,0, 21,4, 9,7 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 721,4 [(M)⁺; calculado para C₃₈H₄₆F₂N₆O₆: 720,8].

Esquema XII



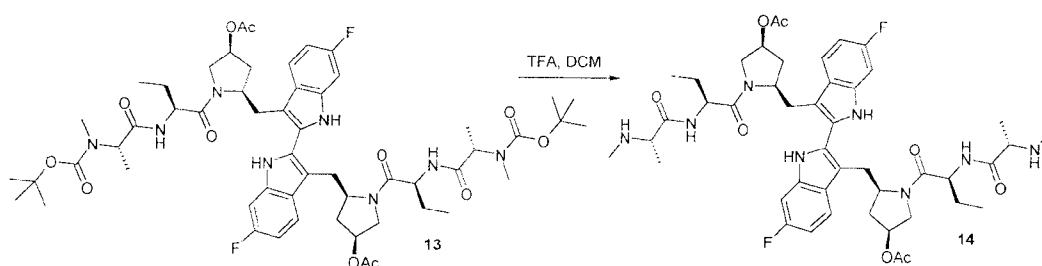
Éster do 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-
amino-propionil- amino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-
[2,2']biindolil-3-il- metil)-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-

5 propionilamino)-butiril]- pirrolidin-3-ílico do ácido acético (13) : A uma
 solução contendo Boc-N(Me)Ala-OH (14,6 g, 72 mmol) e HATU (30,4 g, 80
 mmol) em NMP anidro (150 ml) a 0° C foi adicionado NMM (12 ml, 105
 mmol) seguido pela adição de 12 (30 mmol) em NMP (200 ml). A mistura
 resultante foi deixada aquecer até a temperatura ambiente. Depois de 16 h, a
 10 mistura da reação foi diluída com éter dietílico (1 litro) e lavado
 sucessivamente com a água (1 litro), HCl 1 N (2 × 100 ml), NaHCO₃ saturado
 aquoso (2 × 100 ml), salmoura, secado em Na₂SO₄ anidro, filtrado,
 concentrado para produzir 33,5 g do 13 bruto.

O 13 bruto foi dissolvido em EtOH (50 ml) e depois
 15 lentamente adicionado à água (1000 ml) com agitação vigorosa a 50° C que
 resultou na precipitação de um sólido branco. A mistura heterogênea foi
 esfriada até -5° C. Depois de 16 h, o sólido foi coletado pela filtração a vácuo
 e lavado com a água. O sólido úmido foi secado sob alto vácuo a 50° C para
 produzir 29,9 g do 13 como um sólido branco amarelado. ¹H RMN (300
 20 MHz, CDCl₃) : δ 11,57 (br s, 2 H), 7,40 - 7,60 (m, 4H), 6,89 (m, 2 H), 5,50
 (m, 2 H), 4,75 (m, 2 H), 4,67 (q, J = 6,9 Hz, 2 H), 4,50 (t, J = 9,6 Hz, 2 H),
 4,20 (dd, J = 3,9, 12,3 Hz, 2 H) 3,85 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 3,57 (br d, J = 13,5
 Hz, 2 H), 3,34 (dd, J = 12,0, 13,8 Hz, 2 H), 2,89 (s, 6H), 2,34 (s, 6H), 2,10
 (m, 2 H), 1,95 (dt, J = 6,0, 13,8 Hz, 2 H), 1,79 (dt, J = 7,2, 14,1 Hz, 2 H), 1,52

(s, 18H), 1,39 (d, J = 7,2 Hz, 6H), 1,03 (t, J = 7,2 Hz, 6H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) : δ 174,0, 172,1, 171,9, 170,5, 161,8, 158,7, 137,5, 137,3, 128,4, 125,8, 118,7, 118,6, 108,8, 108,4, 108,1, 98,8, 98,5, 81,0, 74,6, 60,1, 54,0, 52,0, 33,7, 30,5, 28,6, 28,1, 25,9, 21,6, 14,0, 9,9 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 1091,7 [(M) $^+$; calculado para $\text{C}_{56}\text{H}_{76}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_{10}$: 1091,2].

Esquema XIII



Éster do 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-

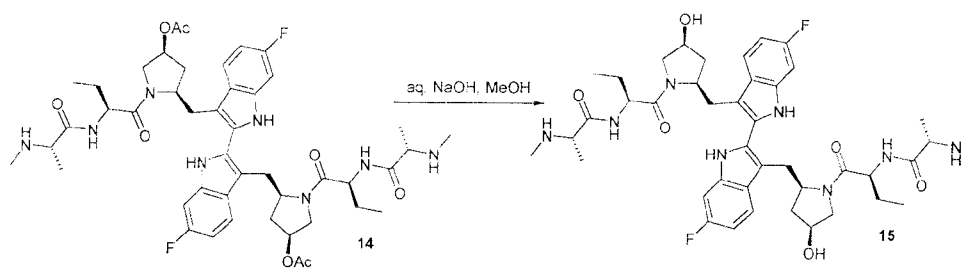
butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-ílico do ácido acético

(14) : Uma solução contendo 13 (28,5 g, 26 mmol) em DCM (150 ml) foi esfriada até 0° C. O TFA (50 ml) foi adicionado. Depois de 30 min, a mistura da reação foi aquecida até a temperatura ambiente e monitorada até a análise de LC/MS revelou a conversão completa do 13 a 14 (cerca de 4 h). O solvente foi removido a vácuo e o resíduo de cor verde escura foi dissolvido em EtOAc (500 ml) e cuidadosamente vertido em uma mistura aquosa de NaHCO_3 /gelo. A fase aquosa foi separada e retro-extraída com EtOAc (2 \times 250 ml). Os extratos orgânicos combinados foram lavados várias vezes com o NaHCO_3 saturado aquoso, depois salmoura, secado em Na_2SO_4 anidro, filtrado e concentrado para produzir 24 g do 14 como um sólido de cor amarelo claro.

^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) : δ 11,66 (br s, 2 H), 8,16 (d, J = 8,4 Hz, 2 H), 7,52 (dd, J = 2,1, 9,6 Hz, 2 H), 7,43 (dd, J = 5,4, 8,4 Hz, 2 H), 6,83 (ddd, J = 2,1, 9,0, 9,0 Hz, 2 H), 5,41 (dd, J = 4,2, 4,5 Hz, 2 H), 4,64 (dd, J = 7,8, 14,1 Hz, 2 H), 4,36 (br d, J = 9,3, 9,6 Hz, 2 H), 4,13 (dd, J = 4,8, 12,6 Hz, 2 H), 3,81 (d, J = 12,0 Hz, 2 H), 3,44 (d, J = 13,2 Hz, 2 H), 3,0 - 3,18 (m, 4H), 2,50 (s, 6H), 2,30 (s, 6H), 2,15 (d, J = 14,4 Hz, 2 H), 1,90 - 2,08 (m, 2 H), 1,76 -

1,90 (m, 2 H), 1,33 (d, $J = 7,2$ Hz, 6H), 1,08 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3) : δ 175,3, 172,6, 170,4, 161,8, 137,5, 137,3, 128,4, 128,3, 125,9, 118,6, 118,5, 108,5, 108,1, 107,8, 98,7, 98,3, 74,5, 60,9, 59,9, 53,9, 51,3, 35,8, 33,6, 27,6, 26,2, 21,5, 20,2, 10,1 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 891,6 [(M) $^+$]; calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{60}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_8$: 891,0].

Esquema XIV



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidróxi-1-[2S-(2S-

metilamino-propionil-amino)-butiril]-pirrolidin-2R-ilmetil}-1H,1'H-

[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidróxi-pirrolidino-1-carbonil]-propil}-2S-

10 metilamino-propionamida (15) : A uma solução contendo 14 (24 g) em MeOH (200 ml) foi adicionado NaOH 1 M (80 ml) a 0°C . A mistura da reação foi desgaseificada e mantida sob uma atmosfera de nitrogênio enrolada com a folha de alumínio. O banho de gelo foi removido. Depois de 60 min, o MeOH foi removido a vácuo e o resíduo foi diluído com a água (200 ml) e
15 extraído com EtOAc (500 ml). A fase aquosa foi separada e retro-extraídas com EtOAc (2×150 ml). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com salmoura e secados em Na_2SO_4 anidro, filtrados e concentrados para produzir 22,5 g do 15 bruto como um sólido de cor marrom claro amarelado .

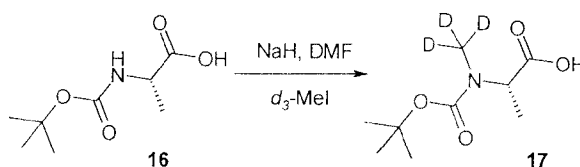
O 15 bruto (22,5 g) foi dissolvido em MeOH (50 ml) e EtOAc (200 ml). O volume foi reduzido (50 %) pela destilação na pressão reduzida a 60°C usando um evaporador rotativo. O MTBE (300 ml) foi adicionado e a solução turva foi aquecida ao 60°C . Depois de 30 min, a solução foi esfriada até a temperatura ambiente e depois mantida a -5°C .

25 Depois de 16 h, o sólido foi coletado pela filtração a vácuo e lavado com EtOAc a 25 %/MTBE feio e secado sob alto vácuo na

temperatura ambiente para produzir 16,6 g do 15 como um sólido branco amarelado. Um adicional de 5,5 g do 15 foi recuperado a partir do filtrado por intermédio da remoção do solvente e secagem a vácuo. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3) : δ 11,74 (s, 2 H), 8,27 (d, $J = 8,7$ Hz, 2 H), 7,71 (dd, $J = 5,4, 8,4$ Hz, 2 H), 7,55 (dd, $J = 2,4, 9,6$ Hz, 2 H), 6,88 (ddd, $J = 2,4, 9,3, 9,3$ Hz, 2 H), 4,62-4,78 (m, 4H), 4,43 (dd, $J = 9,3, 9,9$ Hz, 2 H), 4,03 (dd, $J = 4,8, 11,4$ Hz, 2 H), 3,80 (d, $J = 11,4$ Hz, 2 H), 3,66 (dd, $J = 2,7, 14,4$ Hz, 2 H), 3,53 (dd, $J = 11,4, 14,4$ Hz, 2 H), 3,11 (q, $J = 6,9$ Hz, 2 H), 2,56 (s, 6H), 2,45 (m, 2 H), 2,19 (d, $J = 14,4$ Hz, 2 H), 1,76 - 2,10 (m, 6H), 1,59 (br s, 2 H), 1,39 (d, $J = 6,9$ Hz, 6H), 1,22-1,38 (m, 2 H), 1,07 (t, $J = 7,2$ Hz, 6H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, d_6 -DMSO) : δ 175,2, 172,8, 161,6, 158,5, 137,3, 137,2, 128,4, 128,3, 126,4, 120,8, 120,6, 109,4, 108,7, 108,4, 98,4, 98,0, 70,8, 60,2, 59,9, 56,6, 51,8, 36,4, 35,3, 28,3, 25,6, 20,0, 10,6 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 807,5 [(M)+; calculado para $\text{C}_{42}\text{H}_{56}\text{F}_2\text{N}_8\text{O}_6$: 806,9].

15

Esquema XV

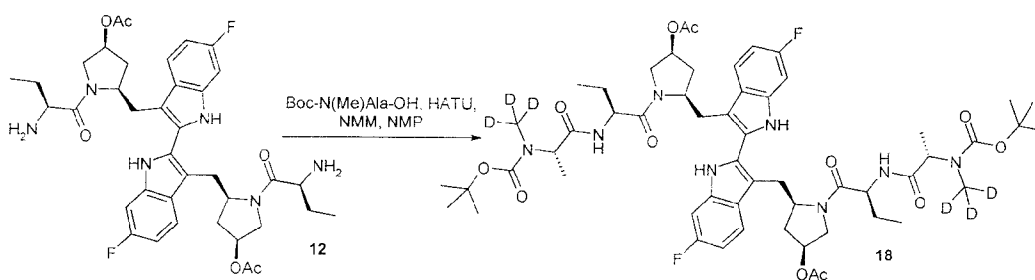
N-terc-butoxicarbonil-N-(d₃-metil)alanina (17) :

A uma solução de Boc-Ala-OH (16, 3,5 g, 18,5 mmol) em THF anidro (50 ml) foi adicionado NaH (2,1 g, 60 % em óleo mineral, 51,0 mmol) a 0° C. Depois de 45 min, a mistura da reação foi aquecida até a temperatura ambiente e depois aquecida a 45° C por um adicional de 20 min. A mistura da reação foi esfriada até 0° C e d₃-iodometano (10,0 g, 69,0 mmol) foi adicionado. A mistura resultante foi agitada na temperatura ambiente. Depois de 16 h, a mistura da reação foi extinta com água, e extraída com EtOAc. A fase orgânica foi descartada e a solução aquosa foi acidificada até o pH 3 com HCl 1 N e extraída com EtOAc. A fase orgânica foi lavada com salmoura, secada em Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada. O resíduo foi purificado pela HPLC de

25

fase reversa (coluna Dynamax 2" C18; 10 a 100 % de ACN/água contendo 0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min) para produzir 17 (3,6 g, 94 %) como um sólido branco seguido pela liofilização. ¹H RMN (300 MHz, d₄-MeOH), mistura de rotâmeros: δ 4,80 (br s, 1 H), 4,67 (q, J = 6,9 Hz, 0,5H), 4,38 (q, J = 6,9 Hz, 0,5H), 1,36 - 1,52 (m, 12H) ppm; Espectro de massa (ESI), m/z 207,0 [(M + H)⁺; calculado para C₉H₁₅D₃NO₄: 207,2].

Esquema XVI



Éster de 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-d₃-metil-(terc-

butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-

10 difluoro-1H,1'H-[2,2']-biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-d₃-metil-(terc-

butoxicarbonil)-amino-propionil- amino)-butiril]-pirrolidin-3-ílico de ácido

acético (18) : A uma solução contendo Boc-N(d₃-Me)Ala-OH (17, 1,00 g,

4,83 mmol) e HATU (2,00 g, 5,30 mmol) em NMP anidro (20 ml) a 0° C foi

adicionado NMM (0,8 ml, 7,20 mmol) seguido pela adição de 12 (bruto, 1,73

15 g, 2,40 mmol) em NMP (20 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer até

a temperatura ambiente. Depois de 16 h, a mistura da reação foi diluída com

éter dietílico (200 ml) e lavada sucessivamente com a água (200 ml), HCl 1 N

(2 × 100 ml), NaHCO₃ saturado aquoso (2 × 100 ml), salmoura, secado em

Na₂SO₄ anidro, filtrado, concentrado. O resíduo foi purificado pela HPLC de

20 fase reversa (Coluna Dynamax 2" C18; 10 a 100 % de ACN/água contendo

0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min). As frações que contêm o produto

foram combinadas, congeladas, e liofilizadas para produzir 1,1 g do 18 (42 %)

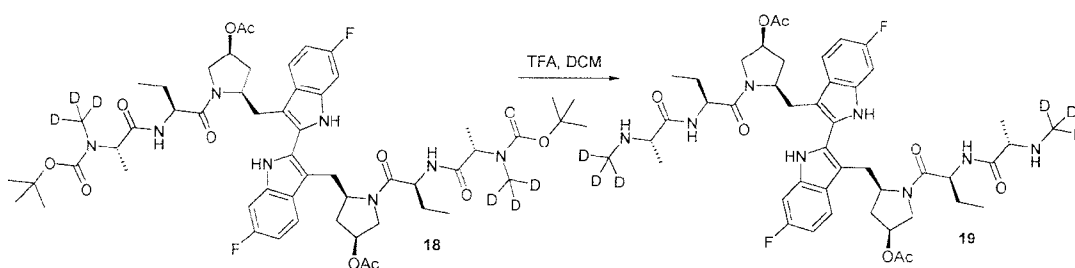
como um sólido branco amarelado. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), mistura de

rotâmeros: δ 11,56 (br s, 2 H), 7,56 (dd, J = 5,4, 8,7 Hz, 2 H), 7,52 (m, 2 H),

25 7,10 (br s, 2 H), 6,89 (ddd, J = 2,1, 9,0, 9,0 Hz, 2 H), 5,47 (t, J = 4,8 Hz, 2 H),

4,75 (br s, 2 H), 4,67 (q, J = 6,9 Hz, 2 H), 4,50 (t, J = 9,3 Hz, 2 H), 4,18 (dd, J = 4,2, 11,7 Hz, 2 H) 3,85 (d, J = 12,6 Hz, 2 H), 3,57 (dd, J = 2,1, 14,4 Hz, 2 H), 3,34 (dd, J = 12,0, 14,4 Hz, 2 H), 2,34 (s, 6H), 2,29 (br s, 2 H), 2,10 (m, 2 H), 1,97 (m, 2 H), 1,79 (m, 2 H), 1,51 (s, 18H), 1,39 (d, J = 6,9 Hz, 6H), 1,03 (t, J = 7,5 Hz, 6H) ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 1097,7 [(M)+; calculado para C₅₆H₇₀D₆F₂N₈O₁₂: 1097,3].

Esquema XVII



Éster de 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-d-metilamino-

propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-ilmetil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-

10 [2,2']biindolil-3-ilmetil)-1-[2-(2-d₃-metilamino-propionilamino)-butiril]-

pirrolidin-3-ílico do ácido acético (19) : Uma solução contendo 18 (1,10 g,

1,00 mmol) em DCM (15 ml) foi esfriada até 0° C. O TFA (5 ml) foi

adicionado. Depois de 30 min, a mistura da reação foi aquecida até a

temperatura ambiente e monitorada até a análise de LC/MS revelou a

15 conversão completa do 18 a 19 (cerca de 4 h). O solvente foi removido a

vácuo e o resíduo de cor verde escura foi dissolvido em EtOAc (100 ml) e

cuidadosamente vertido em uma mistura aquosa de NaHCO₃/gelo. A fase

aquosa foi separada e retro-extraídas com EtOAc (2 × 50 ml). Os extratos

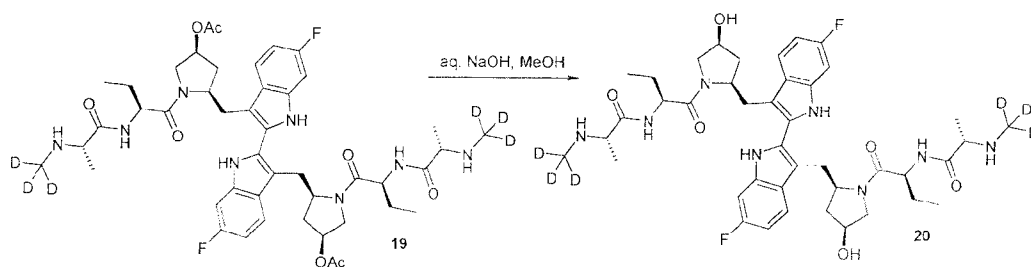
orgânicos combinados foram lavados várias vezes com NaHCO₃ saturado

20 aquoso, e depois salmoura, secados em Na₂SO₄ anidro, filtrados e

concentrados para produzir 19 bruto que foi usado sem outra purificação.

Espectro de massa (ESI), m/z 897,5 [(M)+; calculado para C₄₆H₅₄D₆F₂N₈O₈: 897,0].

Esquema XVIII



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidróxi-1-[2S-(2S-d₃-

metilamino-propionil-amino)-butiril]-pirrolidin-2R-ilmetil}-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-ilmetil)-4S-hidróxi-pirrolidino-1-carbonil]-propil}-2S-d₃-

metilamino-propionamida (20) : A uma solução contendo 19 bruto (cerca de

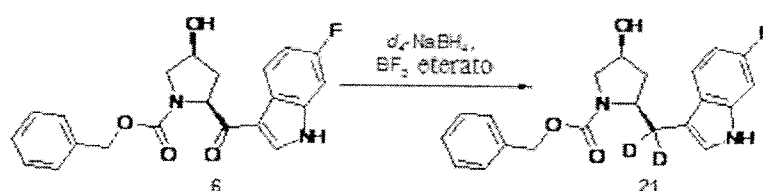
5 1,00 mmol) em MeOH (20 ml) foi adicionado NaOH 1 M (2 ml) na temperatura ambiente. Depois de 35 min, o MeOH foi removido a vácuo e o resíduo foi diluído com a água (50 ml) e extraído com EtOAc (2 × 50 ml). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com salmoura e secados em Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados. O resíduo foi purificado pela HPLC

10 de fase reversa (Coluna Dynamax 2" C18; 10 a 100 % de ACN/água contendo 0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min). As frações que contêm o produto foram combinadas, congeladas, e liofilizadas para produzir 0,6 g de 20 (75 %) como um sólido branco floculento. ¹H RMN (300 MHz, CD₃CN), mistura de rotâmeros: δ 11,86 (s, 2 H), 7,91 (d, J = 7,8 Hz, 2 H), 7,71 (dd, J = 5,4, 8,7

15 Hz, 2 H), 7,45 (dd, J = 2,4, 9,9 Hz, 2 H), 6,83 (m, 2 H), 4,56 (m, 2 H), 4,47 (m, 2 H), 4,20 (m, 2 H), 3,84 (dd, J = 4,2, 11,1 Hz, 2 H), 3,66 (d, J = 11,1 Hz, 2 H), 3,45 (m, 4H), 2,93 (q, J = 6,9 Hz, 2 H), 1,60 - 1,89 (m, 8H), 1,19 (d, J = 6,9 Hz, 6H), 0,94 (t, J = 7,2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CD₃CN + d₄-MeOH), mistura de rotâmeros: δ 175,2, 173,0, 162,4, 159,3, 137,8, 137,6,

20 128,8, 128,7, 126,8, 110,8, 120,7, 109,5, 108,7, 108,4, 98,5, 98,1, 71,6, 60,5, 60,1, 56,8, 52,6, 36,6, 28,6, 26,0, 22,7, 19,0, 10,1 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 813,4 [(M)⁺; calculado para C₄₂H₅₀D₆F₂N₈O₆: 813,0].

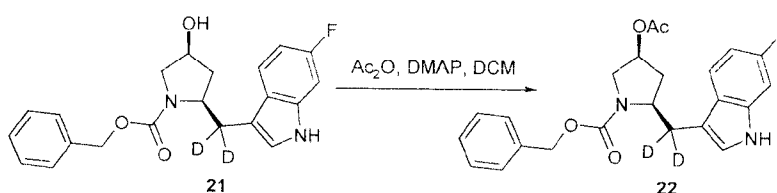
Esquema XIX



5 Éster benzílico do ácido 2-(6-Fluoro-1H-indol-3-il-d₂-metil)-4-hidróxi-pirrolidino-1-carboxílico (21) : Uma suspensão do 6 (3,0 g, 7,85 mmol) em THF anidro (50 ml) foi esfriada até 0° C. d₄-NaBH₄ (0,66 g, 15,7 mmol) foi adicionado em uma porção seguido pela adição de BF₃·eterato (1,1 ml, 8,60 mmol). Depois cerca de 10 min, o banho de gelo foi removido e a mistura da reação foi aquecida ao refluxo.

Depois de 3 h, a mistura da reação foi esfriada em um banho de gelo e cuidadosamente extinta com NH₄Cl saturado aquoso (50 ml). A mistura bifásica foi diluída com EtOAc e a camada orgânica foi separada e lavada com a água (2 × 50 ml) depois salmoura. A camada de EtOAc foi secada em Na₂SO₄ anidro, filtrada e concentrada para produzir 3,2 g do 21 bruto (> quant.) que foi usado sem outra purificação. Espectro de massa (ESI), m/z 371,2 [(M + H)⁺; calculado para C₂₁H₂₀D₂FN₂O₃: 371,4].

Esquema XX

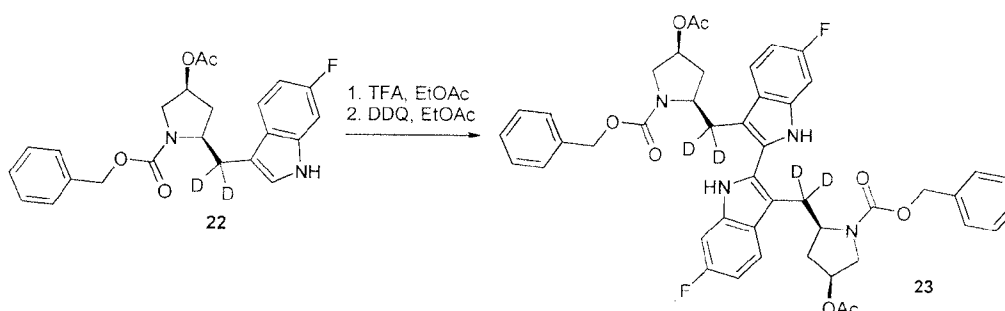


15 Éster benzílico do ácido 4-acetóxi-2-(6-fluoro-1H-indol-3-il-d₂-metil)-pirrolidino-1-carboxílico (22) : A uma solução contendo 21 bruto (cerca de 7,85 mmol), Et₃N (1,2 g, 12,0 mmol), e DMAP (50 mg, cat.) em DCM (30 ml) foi adicionado anidrido acético (0,74 ml, 7,85 mmol) na temperatura ambiente. Depois de 3 h, a mistura da reação foi extinta com NaHCO₃ saturado aquoso (50 ml) depois diluído com DCM. A camada de DCM foi separada e lavada sucessivamente com HCl diluído (50 ml), água (50 ml), e salmoura (50 ml). A solução orgânica foi secada em Na₂SO₄

20

anidro, filtrada e concentrada. O produto bruto foi purificado pela cromatografia em gel de sílica cintilante [30 a 40 % de EtOAc em hexano] para produzir 2,0 g (62 %, 2 etapas) de 22 como uma espuma branca. ^1H RMN (300 MHz, CDCl_3), ~ mistura de rotâmeros 1:1: δ 8,41 (br s, 1 H), 7,80 - 6,50 (m, 9H), 5,25 (m, 1 H), 5,21 (m, 2 H), 4,27 (m, 1 H), 3,82 (dt, $J = 5,1, 13,2$ Hz, 1 H), 3,61 (dd, $J = 11,4, 11,7$ Hz, 1 H), 2,13 (s, 3H), 2,00 (m, 2 H) ppm; ^{13}C RMN (75 MHz, CDCl_3), ~ mistura de rotâmeros 1:1: δ 170,8, 160,2 ($J_{\text{CF}} = 236,2$ Hz), 155,2, 136,9, 136,6, 136,5, 129,0, 128,9, 128,6 ($J_{\text{CF}} = 24,4$ Hz), 124,5 ($J_{\text{CF}} = 22,1$ Hz), 123,1, 120,1 ($J_{\text{CF}} = 27,2$ Hz), 119,9 ($J_{\text{CF}} = 27,2$ Hz), 112,8, 108,2 ($J_{\text{CF}} = 23,5$ Hz), 97,7 ($J_{\text{CF}} = 25,7$ Hz), 74,1, 73,3, 68,0, 67,2, 58,5, 57,6, 53,4, 53,1, 35,4, 34,6, 21,5 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 413,1 [(M)+; calculado para $\text{C}_{23}\text{H}_{21}\text{D}_2\text{FN}_2\text{O}_4$: 412,4].

Esquema XXI

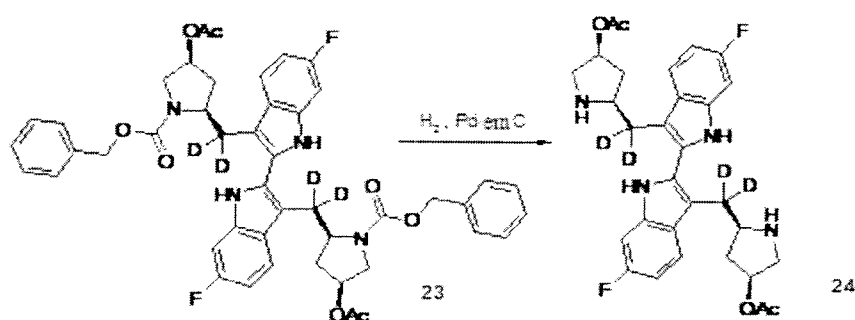


Éster benzílico do ácido 4-acetóxi-2-[3'-(4-acetóxi-1-benziloxycarbonil-pirrolidin-2-il- d_2 -metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il- d_2 -metil]-pirrolidino-1-carboxílico (23) : Indol 22 (2,0 g, 4,80 mmol) foi dissolvido em TFA (10 ml) pré-esfriado (-5°C). A solução de cor amarela resultante foi deixada aquecer lentamente até a temperatura ambiente em 2 h. A mistura da reação foi concentrada a vácuo para remover o TFA e a mistura bruta de diastereômeros de indolilindolina foi usada diretamente na reação seguinte. Espectro de massa (ESI), m/z 825,4 [(M)+; calculado para $\text{C}_{46}\text{H}_{42}\text{D}_4\text{F}_2\text{N}_4\text{O}_8$: 824,9].

A uma solução contendo os diastereômeros de indolilindolina em EtOAc (100 ml) foi adicionado DDQ (0,58 g, 2,5 mmol) em uma porção.

Depois de 15 min, a mistura de reação de cor laranja/marrom foi extinta com NaHCO₃ saturado aquoso. As camadas foram separadas e a fase orgânica foi lavada sucessivamente com NaHCO₃ saturado aquoso (3 × 50 ml) e salmoura, secadas em Na₂SO₄ anidro, filtradas e concentradas. O produto bruto foi dissolvido em DCM (10 ml) e a solução foi depois diluída com MeOH (50 ml). A remoção lenta do DCM a vácuo produziu um precipitado que foi coletado pela filtração a vácuo, lavado com MeOH frio, e secado para fornecer 1,7 g de 23 (86 %, 2 etapas). ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃) : δ 11,30 (br s, 2 H), 7,60 - 7,30 (m, 14H), 6,90 (app. dt, J = 2,4, 9,3 Hz, 2 H), 5,40 (m, 2 H), 5,36 (d, J = 3,6 Hz, 4H), 4,28 (d, J = 8,1 Hz, 2 H), 3,79 (m, 4H), 2,31 (s, 6H), 2,06 (m, 4H) ppm; Espectro de massa (ESI), m/z 823,3 [(M)+; calculado para C₄₆H₄₀D₄F₂N₄O₈: 822,9].

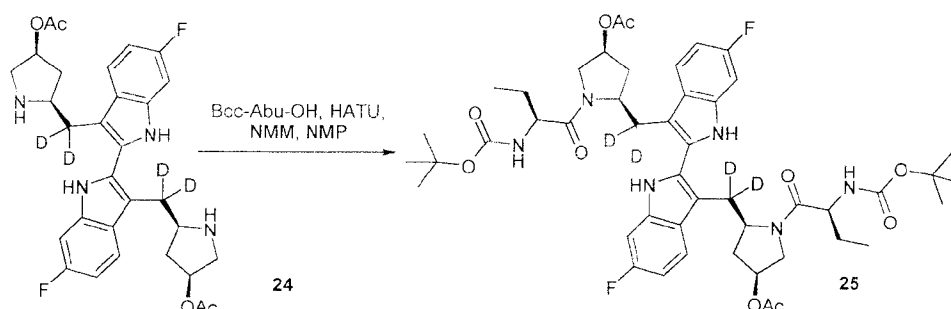
Esquema XXII



Éster do 5-[3'-(4-acetóxi-pirrolidin-2-il-d₂-metil)-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']-biindolil-3-il-d₂-metil]-pirrolidin-3-ílico do ácido acético (24) : Uma suspensão contendo 23 (0,40 g, 0,48 mmol) em EtOAc 1:1 /MeOH (40 ml) foi colocada em uma garrafa de Parr de 500 ml e carregada com 10 % de Pd-em-C (umidade, cerca de 200 mg). A mistura da reação foi pressurizada até 50 PSI (345 kPa) H₂ e agitada por 3 h. A mistura da reação foi filtrada através de uma almofada de Celite[®] e os sólidos foram lavados com EtOAc. O filtrado clarificado foi concentrado a vácuo para produzir 24 bruto como um sólido branco amarelado que foi usado diretamente na reação seguinte. Espectro de massa (ESI), m/z 555,2 [(M)+; calculado para

$C_{30}H_{28}D_4F_2N_4O_4$: 554,6].

Esquema XXIII



Éster de 5-{3'-[4-acetóxi-1-(2-terc-butoxicarbonilamino-

butiril)-pirrolidin-2-il-d₂-metil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-d₂-

5 metil}-1-(2-terc-butoxicarbonilamino-butiril)-pirrolidin-3-ílico do ácido

acético (25): A uma solução contendo Boc-Abu-OH (224 mg, 1,1 mmol) e

HATU (442 mg, 1,2 mmol) em NMP anidro (10 ml) a 0° C foi adicionado

NMM (0,2 ml, 1,7 mmol) seguido por uma solução de 24 (0,48 mmol) em

NMP (10 ml). A mistura da reação foi lentamente aquecida até a temperatura

10 ambiente. Depois de 16 h, a mistura da reação foi diluída com éter dietílico

(100 ml) e a mistura foi lavada sucessivamente com a água (5 × 50 ml), HCl 1

N (50 ml), NaHCO₃ saturado aquoso (50 ml), e salmoura, secado em Na₂SO₄

anidro, filtrada e concentrada. O produto bruto foi purificado pela HPLC de

fase reversa (Coluna Dynamax 2" C18; 10 a 100 % de ACN/água contendo

15 0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min). As frações que contêm o produto

foram combinadas, concentradas, e liofilizadas para produzir 310 mg de 25

(70 %, 2 etapas) como um sólido branco floculento. ¹H RMN (300 MHz,

CDCl₃), mistura de rotâmeros: δ 11,17 (br s, 2 H), 7,39 (dd, J = 5,4, 8,4 Hz, 2

H), 7,29 (d, J = 9,3 Hz, 2 H), 6,75 (dd, J = 8,40, 8,40, 2 H), 6,40 (br s, 2 H),

20 5,44 (m, 2 H), 4,40 (dd, J = 7,8, 16,5 Hz, 2 H), 4,22 (d, J = 7,8 Hz, 2 H), 4,15

(dd, J = 5,1, 12,9 Hz, 2 H), 3,80 (d, J = 12,9 Hz, 2 H), 2,23 (s, 6H), 1,90 (m, 2

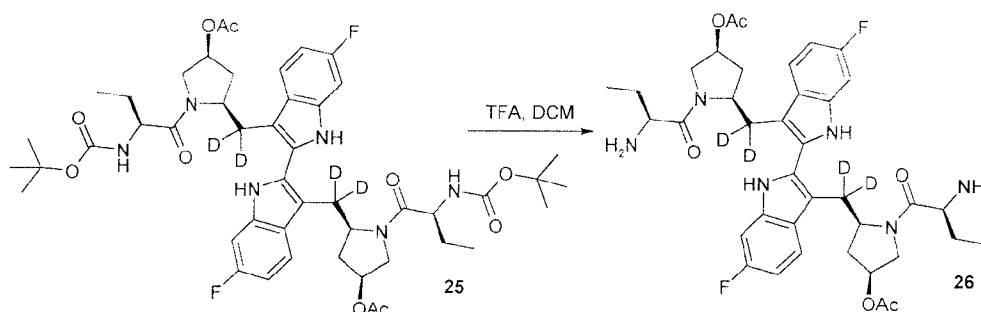
H), 1,74 (m, 2 H), 1,57 (s, 18H), 0,99 (t, J = 7,2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75

MHz, CDCl₃), mistura de rotâmeros: δ 172,1, 170,4, 161,4, 158,2, 155,8,

137,0, 136,9, 128,6, 125,5, 118,9, 118,8, 108,6, 108,4, 108,1, 98,3, 98,0, 80,8,

74,7, 60,3, 53,8, 53,6, 34,1, 28,7, 28,6 (br), 26,2, 21,5, 10,5 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 925,4 [(M)+; calculado para $C_{48}H_{58}D_4F_2N_6O_{10}$: 925,0].

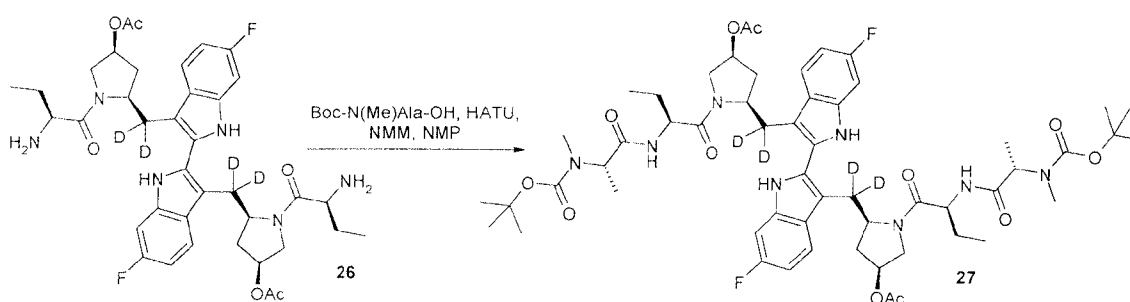
Esquema XXIV



Éster do 5-{3'-[4-acetóxi-1-(2-amino-butiril)-pirrolidin-2-il-

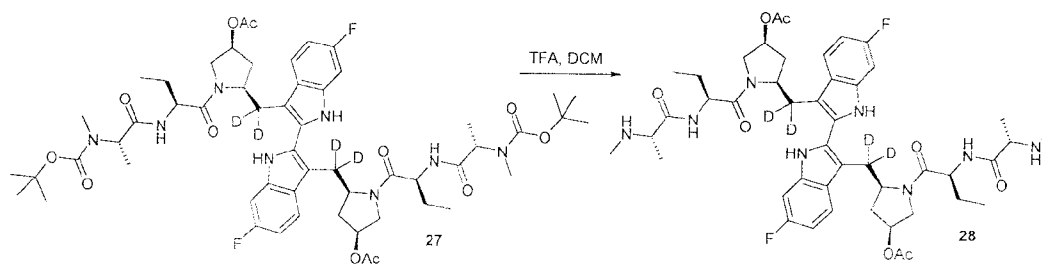
5 d₂-metil]-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-d₂-metil}-1-(2-amino-
 10 butiril)-pirrolidin-3-ílico do ácido acético (26) : Uma solução contendo 25
 (310 mg, 0,34 mmol) em DCM (20 ml) foi esfriada até 0° C. O TFA (5 ml) foi
 adicionado e a reação foi monitorada pela análise de LC/MS até a conversão
 completa de 25 a 26 (cerca de 3 h). O solvente foi removido a vácuo e o
 resíduo de cor verde escura foi dissolvido em EtOAc (50 ml). A solução de
 EtOAc foi cuidadosamente vertida em uma mistura de NaHCO₃ saturado
 aquoso /gelo/água para neutralizar o THF residual. A fase orgânica foi
 separada e lavada duas vezes com NaHCO₃ saturado aquoso depois uma vez
 com salmoura. As lavagens aquosas combinadas foram retro-extraídas com
 15 EtOAc (2 × 20 ml) e os extratos orgânicos combinados foram secados em
 Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados para produzir 26 bruto (250 mg)
 como um sólido branco amarelado. Espectro de massa (ESI), m/z 725,3
 [(M)+; calculado para $C_{38}H_{42}D_4F_2N_6O_6$: 724,8].

Esquema XXV



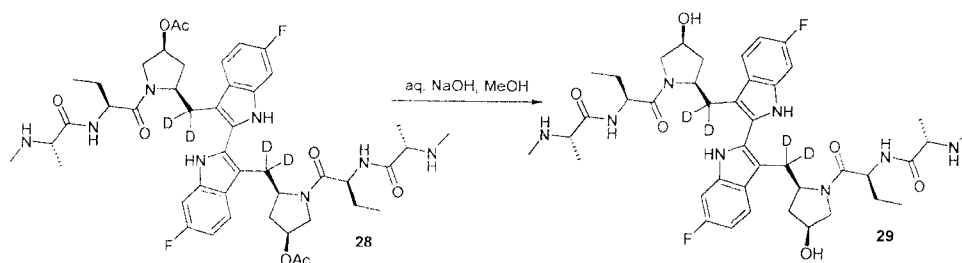
Éster de 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-
amino-propionil-amino)-butiril]-pirrolidin-2-il-d₂-metil}-6,6'-difluoro-
1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-d₂-metil)-1-[2-(2-metil-(terc-butoxicarbonil)-
amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-ílico do ácido acético (27): A uma
5 solução contendo Boc-N(Me)Ala-OH (83 mg, 0,41 mmol) e HATU (172 mg, 0,45 mmol) em NMP anidro (5 ml) a 0° C foi adicionado NMM (0,1 ml, 0,85 mmol) seguido pela adição de 26 bruto (123 mg, 0,17 mmol) em NMP (5 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer até a temperatura ambiente. Depois de 16 h, a mistura da reação foi diluída com éter dietílico (100 ml) e lavada
10 sucessivamente com a água (50 ml), HCl 1 N (2 × 50 ml), NaHCO₃ saturado aquoso (2 × 50 ml), salmoura, secada em Na₂SO₄ anidro, filtrada, concentrada. O produto bruto foi purificado pela HPLC de fase reversa (Coluna Dynamax 2" C18; 10 a 100 % de ACN/água contendo 0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min). As frações que contêm o produto foram
15 combinadas, concentradas, e liofilizadas para produzir 170 mg de 27 (91 %, 2 etapas) como um sólido branco floculento amarelado. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃), mistura de rotâmeros: δ 11,51 (br s, 2 H), 7,40 - 7,60 (m, 4H), 6,86 (m, 2 H), 5,46 (m, 2 H), 4,74 (br s, 2 H), 4,65 (q, J = 6,9 Hz, 2 H), 4,45 (d, J = 8,7 Hz, 2 H), 4,17 (dd, J = 4,8, 12,3 Hz, 2 H) 3,82 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 2,87
20 (s, 6H), 2,28 (s, 6H), 2,05 (m, 2 H), 1,92 (m, 2 H), 1,78 (m, 2 H), 1,48 (s, 18H), 1,37 (d, J = 7,2 Hz, 6H), 1,01 (t, J = 7,2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃), mistura de rotâmeros: δ 173,3, 170,2, 170,1, 170,5, 168,6, 159,9, 135,5, 135,4, 126,5, 126,4, 123,8, 116,8, 116,7, 106,8, 106,4, 106,1, 96,8, 96,5, 79,1, 72,6, 57,9, 52,1, 50,1, 31,7, 28,5, 26,6, 25,5 (br), 23,9, 19,6,
25 19,0, 12,1, 8,0 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 1095,5 [(M)+; calculado para C₅₆H₇₂D₄F₂N₈O₁₂: 1095,3].

Esquema XXVI



Éster de 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il-d₂-metil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-d₂-metil)-1-[2-(2-metilamino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-3-ílico do ácido acético (28) : Uma solução contendo 27 (170 mg, 0,15 mmol) em DCM (15 ml) foi esfriada até 0° C. O TFA (5 ml) foi adicionado. Depois de 30 min, a mistura da reação foi aquecida até a temperatura ambiente e monitorada até a análise de LC/MS revelou a conversão completa de 27 a 28 (cerca de 4 h). O solvente foi removido a vácuo e o resíduo de cor verde escura foi dissolvido em EtOAc (100 ml) e cuidadosamente vertido em uma mistura aquosa de NaHCO₃/gelo. A fase aquosa foi separada e retro-extraídas com EtOAc (2 × 20 ml). Os extratos orgânicos combinados foram lavados várias vezes com NaHCO₃ saturado aquoso, depois salmoura, secados em Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados para produzir 28 bruto como um sólido de cor amarelo claro. Espectro de massa (ESI), m/z 895,3 [(M)⁺; calculado para C₄₆H₅₆D₄F₂N₈O₈: 895,0].

Esquema XXVII



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidróxi-1-[2S-(2S-metilamino-propionil-amino)-butiril]-pirrolidin-2R-il-d₂-metil}-1H,1'H-[2,2']biindolil-3-il-d₂-metil)-4S-hidróxi-pirrolidino-1-carbonil]-propil}-2S-metilamino-propionamida (29) : A uma solução contendo 28 bruto (0,15 mmol) em MeOH (20 ml) foi adicionado NaOH 1 M (5 ml) a 0° C. A mistura

da reação foi desgaseificada e mantida sob uma atmosfera de nitrogênio enrolada com a folha de alumínio. O banho de gelo foi removido. Depois de 60 min, o MeOH foi removido a vácuo e o resíduo foi diluído com a água (20 ml) e extraído com EtOAc (50 ml). A fase aquosa foi separada e retro-

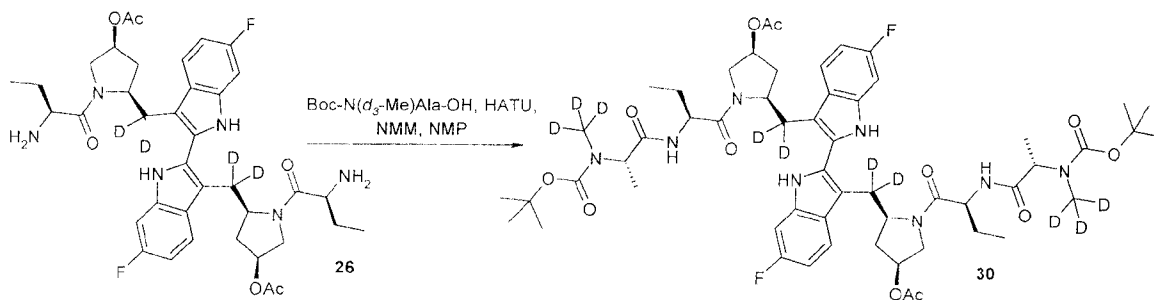
5 extraídas com EtOAc (2 × 50 ml). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com salmoura e secados em Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado pela HPLC de fase reversa (Coluna Dynamax 2" C18; 10 a 100 % de ACN/água contendo 0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min). As frações que contêm o produto foram combinadas, concentradas, e

10 liofilizadas para produzir 110 mg de 29 (90 %, 2 etapas) como um sólido de cor branca floculento. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH), mistura de rotâmeros: δ 11,58 (s, 2 H), 7,80 (dd, J = 5,4, 8,7 Hz, 2 H), 7,45 (dd, J = 2,4, 9,9 Hz, 2 H), 6,87 (ddd, J = 2,4, 9,2, 9,2 Hz, 2 H), 4,66 (dd, J = 5,7, 7,8 Hz, 2 H), 4,60 (br s, 2 H), 4,47 (d, J = 7,2 Hz, 2 H), 4,00 (dd, J = 4,8, 11,4 Hz, 2 H),

15 3,76 (d, J = 11,4 Hz, 2 H), 3,43 (q, J = 6,9 Hz, 2 H), 2,55 (s, 6H), 2,19 (d, J = 14,4 Hz, 2 H), 1,78 - 2,02 (m, 8H), 1,46 (d, J = 7,2 Hz, 6H), 1,09 (t, J = 7,2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH), mistura de rotâmeros: δ 173,6, 171,8, 161,7, 158,6, 137,1, 136,9, 128,1, 128,0, 125,9, 119,8, 119,7, 108,3, 108,2, 107,8, 97,8, 97,5, 70,9, 69,4, 59,0, 56,1, 52,0, 36,3, 35,7, 25,5,

20 18,5, 9,8 ppm. Espectro de massa (ESI), m/z 811,4 [(M)⁺; calculado para C₄₂H₅₂D₄F₂N₈O₆: 810,9].

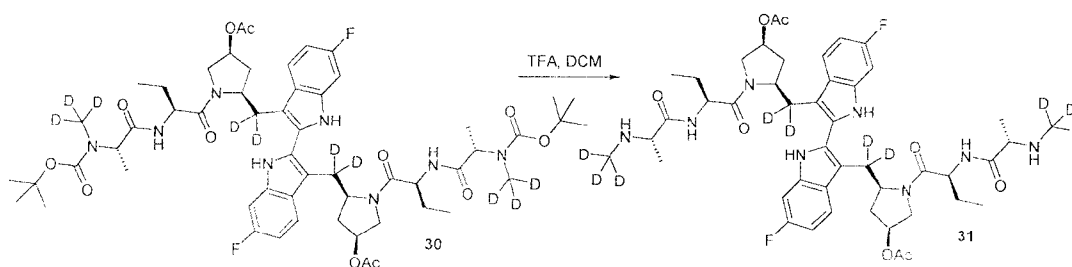
Esquema XXVIII



Éster de 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-d₃-metil-(terc-butoxicarbonil)-amino-propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il-d₂-metil}-6,6'-

difluoro-1H,1'H-[2,2']-biindolil-3-il-d₂-metil)-1-[2-(2-d₃-metil-(terc-
 butoxicarbonil)-amino-propionil- amino)-butiril]-pirrolidin-3-ílico do ácido
 acético (30) : A uma solução contendo Boc-N(d₃-Me)Ala-OH (17, 83 mg,
 0,41 mmol) e HATU (172 mg, 0,45 mmol) em NMP anidro (5 ml) a 0° C foi
 5 adicionado NMM (0,1 ml, 0,85 mmol) seguido pela adição do 26 bruto (123
 mg, 0,17 mmol) em NMP (5 ml). A mistura resultante foi deixada aquecer até
 a temperatura ambiente. Depois de 16 h, a mistura da reação foi diluída com
 éter dietílico (100 ml) e lavada sucessivamente com a água (50 ml), HCl 1 N
 (2 × 50 ml), NaHCO₃ saturado aquoso (2 × 50 ml), salmoura, secado em
 10 anidro Na₂SO₄, filtrado, concentrado. O produto bruto foi purificado pela
 HPLC de fase reversa (Coluna Dynamax 2" C18; 10 a 100 % de ACN/água
 contendo 0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min). As frações que contêm o
 produto foram combinadas, concentradas, e liofilizadas para produzir 160 mg
 do 30 (85 %, 2 etapas) como um sólido de cor branca floculento . ¹H RMN
 15 (300 MHz, CDCl₃), mistura de rotâmeros: δ 11,51 (br s, 2 H), 7,40 - 7,60 (m,
 4H), 6,87 (ddd, J = 2,1, 9,0, 9,0 Hz, 2 H), 5,47 (t, J = 4,8 Hz, 2 H), 4,74 (br s,
 2 H), 4,65 (q, J = 7,2 Hz, 2 H), 4,46 (d, J = 8,1 Hz, 2 H), 4,18 (dd, J = 3,9,
 11,7 Hz, 2 H) 3,83 (d, J = 12,3 Hz, 2 H), 2,30 (s, 6H), 2,24 (m, 2 H), 2,05 (m,
 2 H), 1,93 (m, 2 H), 1,79 (m, 2 H), 1,49 (s, 18H), 1,38 (d, J = 6,9 Hz, 6H),
 20 1,02 (t, J = 7,2 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃), mistura de
 rotâmeros: δ 175,6, 172,2, 172,1, 170,6, 161,8, 158,7, 137,5, 137,3, 128,5,
 128,4, 125,8, 118,7, 118,6, 108,7, 108,4, 108,0, 98,8, 98,4, 81,1, 74,6, 66,1,
 59,9, 54,0, 52,1, 33,7, 28,6, 27,5 (br), 25,8, 21,6, 20,9, 14,0, 9,9 ppm;
 Espectro de massa (ESI), m/z 1101,5 [(M)+; calculado para
 25 C₅₆H₆₆D₁₀F₂N₈O₁₂: 1101,3].

Esquema XXIX



Éster de 5-(3'-{4-acetóxi-1-[2-(2-d₃-metilamino-

propionilamino)-butiril]-pirrolidin-2-il-d₂-metil}-6,6'-difluoro-1H,1'H-

[2,2']biindolil-3-il-d₂-metil)-1-[2-(2-d₃-metilamino-propionilamino)-butiril]-

pirrolidin-3-ílico do ácido acético (31) : Uma solução contendo 30 (160 mg,

5 0,14 mmol) em DCM (15 ml) foi esfriado até 0° C. O TFA (5 ml) foi adicionado. Depois de 30 min, a mistura da reação foi aquecida até a temperatura ambiente e monitorada até a análise de LC/MS revelou a

conversão completa do 30 a 31 (cerca de 4 h). O solvente foi removido a

10 vácuo e o resíduo de cor verde escura foi dissolvido em EtOAc (100 ml) e

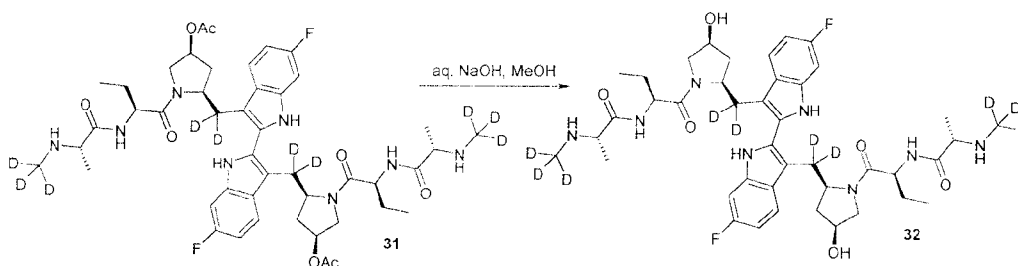
cuidadosamente vertido em uma mistura aquosa de NaHCO₃/gelo. A fase

aquosa foi separada e retro-extraídas com EtOAc (2 × 20 ml). Os extratos

15 orgânicos combinados foram lavados várias vezes com NaHCO₃ saturado

aquoso, depois salmoura, secados em Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados

Esquema XXX



N-{1S-[2R-(6,6'-Difluoro-3'-{4S-hidróxi-1-[2S-(2S-

metilamino-propionil- amino)-butiril]-pirrolidin-2R-il-d₂-metil}-1H,1'H-

[2,2']biindolil-3-il-d₂-metil)-4S-hidróxi-pirrolidino-1-carbonil]-propil}-2S-

20 metilamino-propionamida (32) : A uma solução contendo 31 bruto (0,14

mmol) em MeOH (20 ml) foi adicionado NaOH 1 M (5 ml) a 0° C. A mistura

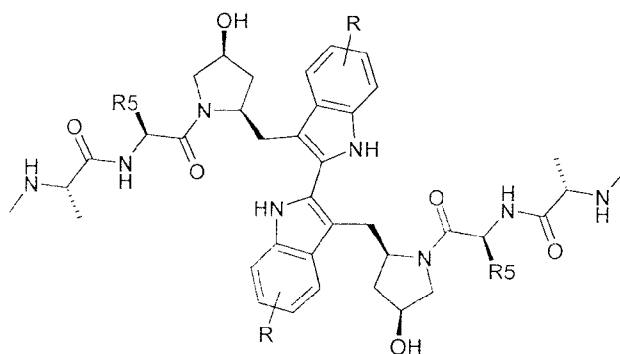
da reação foi desgaseificada e mantida sob uma atmosfera de nitrogênio enrolada com a folha de alumínio. O banho de gelo foi removido. Depois de 60 min, o MeOH foi removido a vácuo e o resíduo foi diluído com a água (20 ml) e extraído com EtOAc (50 ml). A fase aquosa foi separada e retro-
5 extraídas com EtOAc (2 × 50 ml). Os extratos orgânicos combinados foram lavados com salmoura e secado em Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado pela HPLC de fase reversa (Coluna Dynamax 2” C18; 10 a 100 % de ACN/água contendo 0,1 % de HOAc em 30 min; 40 ml/min). As frações que contêm o produto foram combinadas, concentradas, e
10 liofilizadas para produzir 100 mg do 32 (87 %, 2 etapas) como um sólido de cor branca floculento. ¹H RMN (300 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH), mistura de rotâmeros: δ 11,62 (s, 2 H), 7,79 (dd, J = 5,4, 8,4 Hz, 2 H), 7,47 (dd, J = 2,4, 10,2 Hz, 2 H), 6,87 (ddd, J = 2,4, 9,2, 9,2 Hz, 2 H), 4,68 (dd, J = 5,4, 7,5 Hz, 2 H), 4,58 (m, 2 H), 4,45 (d, J = 6,6 Hz, 2 H), 3,99 (dd, J = 4,8, 11,1 Hz, 2 H),
15 3,75 (d, J = 11,1 Hz, 2 H), 3,19 (q, J = 6,9 Hz, 2 H), 2,15 (br d, J = 12 Hz, 2 H), 1,78 - 2,02 (m, 8H), 1,39 (d, J = 6,6 Hz, 6H), 1,07 (t, J = 7,5 Hz, 6H) ppm; ¹³C RMN (75 MHz, CDCl₃ + d₄-MeOH), mistura de rotâmeros: δ 175,4, 172,0, 161,8, 158,7, 137,1, 137,0, 128,2, 128,0, 126,0, 119,9, 119,7, 108,4, 108,3, 107,9, 98,0, 97,6, 71,0, 60,0, 59,6, 56,2, 51,6, 36,4, 25,8, 19,5, 9,8
20 ppm; Espectro de massa (ESI), m/z 817,4 [(M)+; calculado para C₄₂H₄₆D₁₀F₂N₈O₆: 817,0].

Exemplos 2, 3, 4, e 5

Os compostos testados nos Exemplos 2, 3, 4, e 5 são mostrados na Tabela 1.

25

Tabela 1



Composto	R5	R
15	-CH ₂ CH ₃	6-F
2	-CH(CH ₃)CH ₃	6-F
3	-R-CH(OH)CH ₃	6-F
4	-S-CH(OH)CH ₃	6-F
5	-R-CH(OCH ₃)CH ₃	6-F

Exemplo 2A. Ensaio de Degradação de cIAP

A concentração que induz a degradação de cIAP-1 e cIAP-2 em 50 % (IC₅₀) para vários compostos foi determinada pelo monitoramento do desaparecimento do sinal da Proteína Fluorescente Verde (GFP) em células A375. Resumidamente, as linhagens de célula A375 que expressam cIAP-1 e cIAP-2 rotulados com GFP foram geradas transfectando-se o vetor HA2xEGFP-pcDNA3 contendo a região codificadora de cIAP-1 (A375Gc1) ou cIAP-2 (A375Gc2). 2 x 10⁴ de células de A375Gc1 ou A375Gc2 foram cultivados em placa de 96 reservatórios e tratados com várias concentrações de compostos de teste por 2 h. Depois da incubação, as células foram coletadas pela tripsinização e colocadas em suspensão em 150 µl de DMEM-10 % FBS. Um total de 10⁴ células foram analisadas usando um FACScan (Becton Dickinson). A fluorescência de GFP foi monitorada usando-se um filtro de excitação a 488 nm e a emissão foi medida com um filtro de 530 nm. IC₅₀ é definida como a concentração de medicamento na qual 50 % do sinal de GFP foram inibidos.

Os resultados do ensaio de degradação de cIAP-1 e -2 são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2

Composto	GFP-cIAP-1 IC ₅₀	SD	GFP-cIAP-2 IC ₅₀	SD	Razão IC ₅₀ de CIAP-2/cIAP-1

	(nM)		(nM)		
15	27 (n = 56)	15	174 (n = 61)	100	6,4
2	4 (n = 3)	0,6	7 (n = 3)	0,8	1,8
3	328 (n = 3)	83	674 (n = 3)	69	2,1
4	464 (n = 12)	112	604 (n = 12)	192	1,3
5	10 (n = 41)	2	37 (n = 38)	19	3,7

Estes dados mostram que o Composto 15 tem potência relativa maior na degradação de cIAP-1 em relação ao cIAP-2 quando comparado com os Compostos 2, 3, 4, e 5.

Exemplo 2B. Ensaio de Desrepressão de Caspase-3

5 As células de tumor MDA-MB-231 exponencialmente cultivadas (ATCC) foram colhidas pela tripsinização e coletadas pela centrifugação em uma centrífuga de bancada a 1000xg por 10 minutos na temperatura ambiente. A pelota de célula foi lavada uma vez recolocando-se em suspensão em 5 ml de tampão de lise hipotônico (20 mM de HEPES, pH 10 7,5, 10 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 mM de EDTA, 1,0 mM de DTT) e recoletada pela centrifugação. A pelota foi em seguida recolocada em suspensão em 1 volume de tampão de lise hipotônico suplementado com um tablete de inibidor de protease completo (Roche) e deixado intumescer em gelo por 30 minutos. As células foram rompidas por aproximadamente 15 passagens através de uma agulha de calibre 27. A lise foi monitorada pelo microscópio de luz. O lisado foi centrifugado a 12000xg por 10 minutos a 4° C para remover a fração de membrana, células não lisadas e fragmentos. A fração solúvel foi coletada para a determinação da concentração de proteína e análise de ensaio subsequente.

20 O lisado hipotônico (25 µg de proteína), 50 µg/ml de citocromo c e 10 mM de dATP foram combinados em um tubo de microcentrífuga a um volume final de 9 µl em tampão de lise hipotônico seguido pela adição de composto de teste e incubados por 30 minutos na temperatura ambiente. A seguir da incubação 50 µl de tampão de lise 25 hipotônico contendo 5 µM de substrato de caspase 3 com base em rodamina-110₍₂₎ pró-fluorescente zDEVD-R110₍₂₎ foi adicionado e a intensidade da

fluorescência foi monitorada com o tempo. A ativação do lisado pela adição de citocromo c e dATP resulta na formação de apoptossoma e a ativação subsequente das caspases 9 e 3. XIAP endógeno inibe muita desta atividade e a adição de composto de teste ao lisado ativado resulta em mais atividade de caspase do que é gerada pelo lisado ativado sozinho como medido pelo aumento na intensidade de fluorescência na clivagem de zDEVD-R110₍₂₎ pela caspase 3. Os valores de IC₅₀ foram calculados usando GraphPad Prism pelo aumento de plotagem na intensidade de fluorescência vs. concentrações diferentes dos Compostos testados e os resultados são mostrados na Tabela 3.

10 Tabela 3

<u>Composto</u>	<u>IC₅₀ da Desrepressão da Caspase-3 pelo XIAP (nm)</u>	<u>SD</u>
15	24,3 (n = 3)	2,0
2	13,4 (n = 3)	4,3
3	0,2 (n = 3)	0
4	0,35 (n = 3)	0,2
5	0,36 (n = 3)	0,05

Estes dados mostram que o Composto 15 tem uma potência mais baixa para antagonizar a função de XIAP em comparação com os Compostos 2, 3, 4, e 5.

Exemplo 3 - Citotoxicidade

15 Os dados de citotoxicidade da célula de tumor ovariano SKOV-3 foram gerados substancialmente como segue. O ensaio com MTT (brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) é um exemplo de um ensaio que foi usado para medir o crescimento de célula como anteriormente descrito (Hansen, M. B., Nielsen, S. E., e Berg, K. (1989) J. Immunol. Methods 119, 203–210) e aqui incorporado por referência na sua totalidade. Em resumo, as células SK-OV-3 foram semeadas em placas de 96 reservatório em meio de McCoy contendo 10 % de albumina sérica de bovino fetal (5.000 por reservatório) e incubados durante a noite a 37° C. No dia seguinte, os compostos de teste foram adicionados em várias concentrações
20
25 (0,003 a 10 µM) e as placas foram incubadas a 37° C por um adicional de 72

horas. Este tempo de incubação foi ideal para medir os efeitos inibidores de análogos diferentes. Cinquenta microlitros de reagente MTT a 5 mg/ml a cada reservatório foram adicionados e as placas foram incubadas a 37° C por 3 horas. No final do período de incubação, 50 microlitros de DMSO foi adicionado a cada reservatório para dissolver as células e a densidade óptica (OD) dos reservatórios foi medida usando uma leitora de microplaca (Victor² 1420, Wallac, Finlândia) a 535 nm. A sobrevivência de célula (CS) foi calculada pela seguinte equação:

$$CS = (OD \text{ do reservatório tratado} / OD \text{ média dos reservatórios de controle}) \times 100 \%$$

A CC₅₀, definida como a concentração de medicamento que resulta em 50 % de CS, foi derivada calculando-se o ponto onde a curva de resposta de dose cruza o ponto CS de 50 % usando GraphPad Prism. Estes resultados sugerem que os miméticos de Smac que se ligam a cIAP-1 podem ser usados no tratamento de câncer como monoterapia ou em combinação com produtos quimioterapêuticos. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade de SKOV-3 para os compostos testados neste ensaio são mostrados na Tabela 4.

Tabela 4

<u>Composto</u>	<u>CC₅₀</u> <u>(nM)</u>	<u>Desvio Padrão</u> <u>(nM)</u>
15	0,14 (n = 76)	0,02
2	0,5 (n = 6)	0,1
3	13 (n = 4)	4
4	2 (n = 23)	0,3
5	0,13 (n = 76)	0,1

Estes dados indicam que o Composto 15 tem potência equivalente ao Composto 5 e é mais potente do que os Compostos 2, 3, e 4.

Exemplo 4 – Toxicidade

A perda de peso corporal (BWL), mortalidade e dados de toxicidade adicionais foram gerados substancialmente como segue. Os ratos Sprague-Dawley foram dosados diariamente (QDx4, bolo i.v. impulso lento)

com os Compostos 15, 4 e 5. Os pesos corporais foram tirados nos dias 4 e são mostrados como mudança percentual do dia 1. Os compostos 4 e 5 foram administrados a 0,3 mg/Kg, 1 mg/Kg, ou 3 mg/Kg; o Composto 15 foi administrado a 1, 5, ou 10 mg/Kg.

5 Os resultados do ensaio de BWL são mostrados na Fig 1.

Mortalidade. Os Compostos 4 e 5 não foram tolerados a 3 mg/Kg, e fez com que os animais morressem nesta dose. Nenhuma mortalidade foi observada com o Composto 15 a 5 mg/Kg (a mortalidade foi observada a 10 mg/Kg).

10 Resultados Clínicos. Não houve nenhum sinal clínico a 1 mg/kg/dia com o Composto 15 depois de 4 dias de administração. Os animais tratados com o Composto 15 a 5 mg/kg/dia exibiram sinais clínicos similares aos Compostos 4 e 5 a 1 mg/kg/dia tal como letargia, respiração aumentada/irregular e frequência cardíaca aumentada. Os ratos tratados com 1
15 mg/kg de Composto 5 exibiram observações clínicas adicionais incluindo desidratação, aparência despenteada, cromorrinorréia, alopecia (cabeça), e arranhadura excessiva a partir dos dias 2 a 4.

Peso Corporal. A 1 mg/Kg, os animais que receberam os Compostos 4 e 5 perderam peso ao passo que os animais que recebem o
20 Composto 15 a 1 mg/kg/dia ganharam peso. A 5 mg/kg/dia com o Composto 15, uma perda de peso corporal relacionada com o tratamento de aproximadamente 8 % foi observada a partir do dia 1 até o dia 4. Uma perda de peso corporal média relacionada com o tratamento de aproximadamente 4 % e 6 % foi observada em animais tratados com os Compostos 4 e 5,
25 respectivamente, a 1 mg/kg/dia.

Patologia. A avaliação de patologia anatômica depois do tratamento com os Compostos 4 e 5 a 1 mg/kg/dia resultou nas seguintes descobertas. Houve hipocelularidade da medula óssea de acentuada a severa da série de eritróide, hipercelularidade de branda a moderada da série

mielóide, e hipertrofia e hiperplasia de branda a moderada de megacariócitos na tíbia e esterno quando os Compostos 4 e 5 foram administrados a 1 mg/kg/dia. Para os Compostos 4 e 5 os pulmões tiveram hipertrofia/hiperplasia difusa de branda a moderada relacionada com a dose de pneumócitos Tipo 2 que foram acompanhados por um aumento nos macrófagos alveolares, epitélio bronquiolar hiperatrofiado, células mononucleares perivasculares proliferantes e células pleurais viscerais hiperatrofiadas. Ao contrário, a avaliação de patologia anatômica a seguir do tratamento com o Composto 15 na mesma dose (1 mg/kg/dia) identificou hipocelularidade mínima a branda de células eritróide, hipercelularidade de mínima a branda de células mielóide, e hipertrofia de pneumócito Tipo 2 mínima nos pulmões.

Os dados descritos acima indicam que o Composto 15 é aproximadamente 5 vezes melhor tolerado no rato quando comparado com os Compostos 4 e 5 em uma dose por base de dose.

Exemplo 5 –Redução do Volume de Tumor e Mudança no Peso Corporal

Os dados de xenoenxerto MDA-MB-231 foram gerados substancialmente como segue. As células de tumor de mama humanas MDA-MB-231 foram injetadas na almofada de gordura mamária de camundongos nucleotídeo fêmeas e a dosagem iniciada doze dias mais tarde em um volume de tumor médio de aproximadamente 148 mm³. Nenhuma carga de tumor foi associada com este modelo com base na falta de perda de peso ou morbidez do animal em grupos de controle. Os camundongos foram injetados subcutaneamente na almofada de gordura mamária com 1 x 10⁷ células colocadas em suspensão em 200 µl de uma solução 1:1 de HBSS:Matrigel; as células injetadas foram dentro de nove passagens do lote original. Os volumes de tumor no pré-estudo foram registrados começando aproximadamente uma semana antes da data de início estimada. Quando os tumores atingiram aproximadamente 150 mm³ os animais são igualados pelo volume do tumor

em grupos de tratamento e controle e a dosagem iniciada (Dia 0); os camundongos são rotulados e acompanhados individualmente por todo o experimento. Os animais foram dosados pelo peso (0,01 ml por grama; 10 ml/Kg).

5 Começando no Dia 0, os animais foram observados diariamente e pesados duas vezes por semana usando uma balança digital (Ohaus SP601); os dados incluindo os pesos em grama individuais e médios (Peso médio \pm SD), a mudança de peso percentual médio versus Dia 0 (% vD₀) e a mudança de peso percentual médio versus a medição anterior (% vD.
10 x) foram registrados para cada grupo e plotados na conclusão do estudo.

 Começando no Dia 0, as dimensões de tumor foram medidas duas vezes por semana pelo calibre digital (Fowler Ultra-Cal IV) e os dados incluindo volumes de tumor estimados individual e médio (TV médio \pm SEM) registrados para cada grupo; o volume de tumor foi calculado usando a
15 fórmula: $TV = largura^2 \times comprimento \times 0,52$. Os camundongos individuais que atingem o ponto final de estudo designado (um volume de tumor estimado de aproximadamente 1 cm³) foram designados uma vez para o valor de ponto final (TTE) que corresponde a aquele dia; o estudo da demora do crescimento de tumor (TGD) foi concluído uma vez que todos os
20 camundongos atingiram o ponto final de estudo ou sessenta dias a seguir do início do estudo. Na conclusão do estudo, TGD e % TGD são calculados usando o valor de TTE médio (MTTE) para cada grupo de tratamento (T) versus controle (C) pelas fórmulas: $TGD_{(dias)} = T-C$ e $\% TGD = T-C/C \times 100$, em que T-C é a diferença entre Grupo de Tratamento com MTTE e Controle
25 de MTTE. Os animais com tumor que não atingiram o ponto final de volume designado pela conclusão do estudo são considerados sobreviventes de longa duração (LTS) e designados com um valor TTE que corresponde ao dia do estudo final; os animais isentos de tumor não são incluídos nos cálculos de TGD. Um teste de classificação de Log é usado para determinar

estatisticamente diferenças significantes na experiência de sobrevivência global entre cada grupo tratado comparado com o controle. Os camundongos individuais que relatam um volume de tumor $\leq 50\%$ da medição do Dia 0 para duas medições consecutivas em um período de sete dias foram considerados respondedores parciais (PR). Se os PR persistiram até a conclusão do estudo, a regressão de tumor percentual (% TR) foi determinada usando a fórmula: $\% TR = 1 - T_f / T_i \times 100$; um valor médio foi calculado se camundongos PR múltiplos ocorreram em um grupo. Camundongos individuais que carecem de tumores palpáveis ($< 4 \times 4 \text{ mm}^2$ por duas medições consecutivas em um período de sete dias) foram classificados como respondedores completos (CR); um CR que persistiu até a conclusão do estudo foi considerado um sobrevivente isento de tumor (TFS); os animais TFS são excluídos dos cálculos de TGD e da análise estatística. As diferenças estatísticas nos valores MTTE entre os grupos de controle e tratamento são comparados usando um teste de Classificação de Log.

O Composto 15 foi administrado pela injeção i.p. sozinho a 20, 40 ou 60 mg/Kg em um programa q3dx5 (a cada três dias por 5 ciclos). Os valores T-C de 22 dias foram calculados para estes grupos, todos dos quais foram descobertos ser estatisticamente significantes comparados com o controle ($p = 0,005$, $p < 0,0001$, ou $p = 0,0001$). No grupo de 20 mg/Kg, 6/10 camundongos foram considerados sobreviventes de longa duração e a regressão de tumor parcial foi relatada em três camundongos. No grupo de 40 mg/Kg, 9/10 camundongos foram considerados sobreviventes de longa duração e a regressão de tumor parcial foi relatada em três camundongos. No grupo de 60 mg/Kg, 8/10 camundongos foram considerados sobreviventes de longa duração e regressão de tumor parcial foi relatada em sete camundongos.

O Composto 5 foi administrado pela injeção i.p. sozinho a 15 mg/Kg em um programa q3dx5. Um valor T-C de 21 dias foi calculado para este grupo que foi descoberto ser estatisticamente significativo comparado

com o controle ($p = 0,002$). Neste grupo 3/10 camundongos foram considerados sobreviventes de longa duração e a regressão de tumor parcial foi relatada em cinco camundongos. A eficácia deste nível de dose produziu metade do número de sobreviventes de longa duração como 20 mg/Kg de Composto 15.

Os resultados dos ensaios de xenoenxerto de MDA-MB-231 são mostrados nas Figuras 2A e 2B. O Composto 15 a 20 mg/Kg teve atividade antitumor comparável ao Composto 5 em 15 mg/Kg. Estudos subsequentes mostraram que a dose eficaz mínima do Composto 15 neste modelo é menor do que 1 mg/Kg. A perda de peso foi maior nos camundongos administrados com o Composto 5 a 15 mg/Kg quando comparado com os camundongos dosados com o Composto 15 a 20 mg/Kg. Assim, o Composto 15 tem eficácia comparável com menos toxicidade em relação ao Composto 5 e portanto tem um índice terapêutico melhorado.

O composto da Fórmula 1 é particularmente bem tolerado e bem adequado para o uso em uma composição farmacêutica, assim como em um método para tratar um distúrbio proliferativo ou um distúrbio autoimune. Em particular, a composição farmacêutica da invenção para o tratamento de um distúrbio proliferativo, que compreende uma quantidade eficaz de Composto 15 além de pelo menos um excipiente farmacêuticamente aceitável, pode melhorar o índice terapêutico pela redução das toxicidades. As toxicidades reduzidas incluem, por exemplo, um de, ou qualquer combinação de um ou mais de:

- perda de peso corporal reduzida,
- incidência diminuída de mortalidade,
- hipocelularidade da medula óssea reduzida da série de eritróide,
- hiper celularidade da série mielóide reduzida,
- hipertrofia e hiperplasia reduzida de megacariócitos,

- hipertrofia/hiperplasia difusas reduzidas de pneumócitos

Tipo 2

- letargia diminuída,
- respiração mais regular,
- aumento diminuído na frequência cardíaca.

5

As toxicidades reduzidas listadas acima são aquelas observadas nos animais testado. As toxicidades reduzidas similares, adicionais, ou diferentes serão observadas em seres humanos. As reduções são relativas, por exemplo, em relação ao grau em que as toxicidades seriam observadas a seguir da administração interna de uma composição farmacêutica em que o ingrediente farmacêutico ativo é um análogo de Composto 15, por exemplo, um ou mais dos análogos em que R5 é – CH₂CH₃, –CH(CH₃)CH₃, –R-CH(OH)CH₃, –S-CH(OH)CH₃, e –R-CH(OCH₃)CH₃, por exemplo, na mesma dose ou em uma dose de potência comparável.

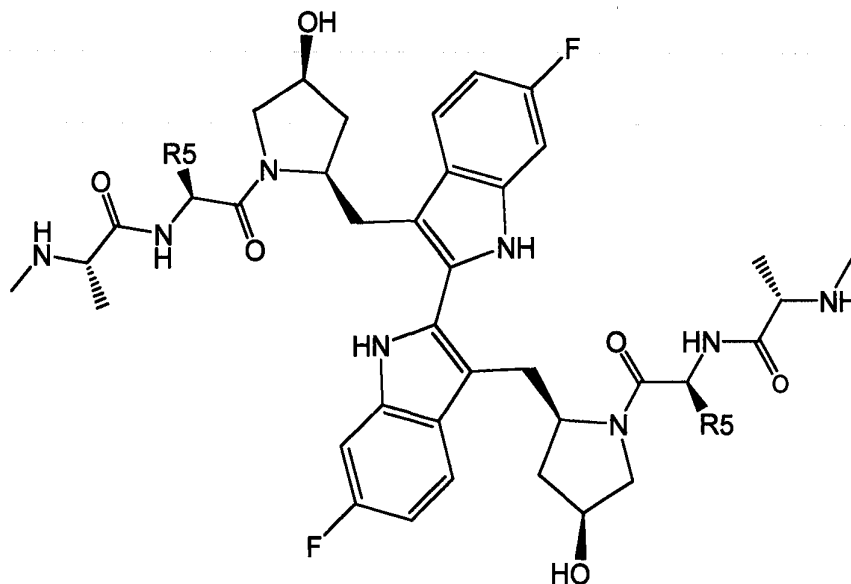
15

É entendido que os exemplos e formas de realização aqui descritas são apenas para propósitos ilustrativos e que várias modificações ou mudanças considerando os mesmos serão sugeridas às pessoas habilitadas na técnica e devem ser incluídas dentro do espírito e alcance deste pedido e do escopo das reivindicações anexas.

20

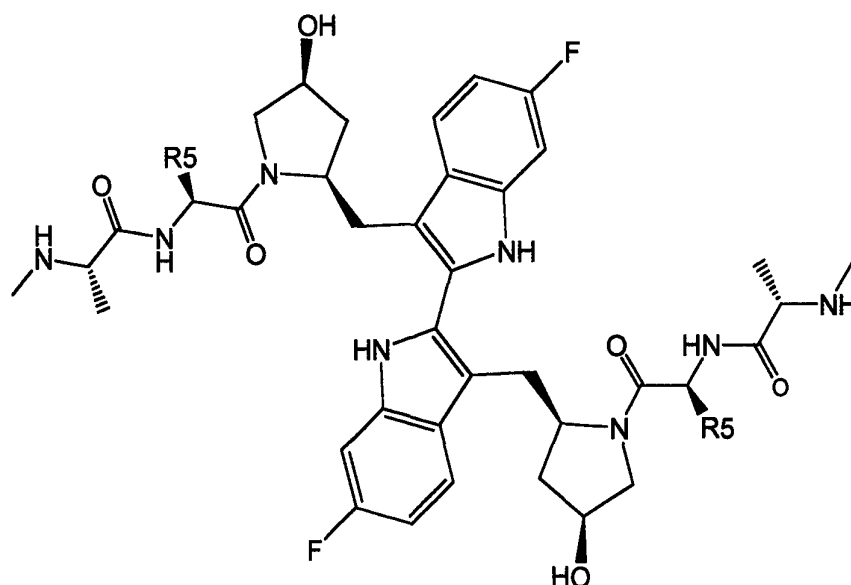
REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que tem a fórmula:



em que R5 é $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

2. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que
5 compreende o composto tendo a fórmula:



em que R5 é $-\text{CH}_2\text{CH}_3$, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e um excipiente farmacologicamente aceitável.

3. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2,
caracterizada pelo fato de que é para o tratamento de um distúrbio
10 proliferativo.

4. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que é para o tratamento de um câncer.

5. Composição farmacêutica de acordo com as reivindicações 2, 3, ou 4, caracterizada pelo fato de que é um líquido estéril para injeção.

5 6. Composição farmacêutica de acordo com as reivindicações 2, 3, 4, ou 5, caracterizada pelo fato de que está em uma forma de dose unitária.

7. Uso de um composto como definido na reivindicação 1, ou de um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio proliferativo.

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o distúrbio proliferativo é um câncer selecionado do grupo que consiste em: adenocarcinoma pulmonar, câncer pancreático, câncer colônico, câncer ovariano, câncer mamário, mesotelioma, neuroma periférico, câncer da bexiga, glioblastoma, melanoma, carcinoma adrenocortical, linfoma relacionado com a AIDS, câncer anal, câncer da bexiga, meningioma, glioma, astrocitoma, câncer mamário, câncer cervical, distúrbios mieloproliferativos crônicos (por exemplo, leucemia linfocítica crônica, leucemia mielógena crônica), câncer colônico, cânceres endócrinos, câncer endometrial, ependimoma, câncer esofágico, sarcoma de Ewing, tumores de célula germinativa extracraniana, tumores de célula germinativa extragonadal, câncer do duto biliar extraepático, câncer da vesícula biliar, câncer gástrico, tumores carcinóides gastrointestinais, tumores trofoblástico gestacional, leucemia de célula pilosa, linfoma de Hodgkin, linfoma de não Hodgkin, câncer hipofaríngeo, melanoma intraocular, carcinoma de célula da ilhota, sarcoma de Kaposi, câncer laríngeo, leucemia, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielóide aguda, câncer labial, câncer da cavidade oral, câncer hepático, câncer mamário masculino, mesotelioma maligno, meduloblastoma,

melanoma, carcinoma de célula de Merkel, câncer de pescoço escamosos metastático, mieloma múltiplo e outros neoplasmas de célula plasmática, fungóides de micose e a síndrome de Sezary, síndromes mielodisplásticas, câncer nasofaríngeo, neuroblastoma, câncer pulmonar de célula não pequena, 5 câncer pulmonar de célula pequena, câncer orofaríngeo, cânceres ósseos, incluindo osteossarcoma e histiocitoma fibroso maligno do osso, câncer epitelial ovariano, tumores de célula germinativa ovariana, tumores de potencial maligno baixo ovarianos, câncer pancreático, câncer do seno paranasal, câncer da paratireóide, câncer peniano, feocromocitoma, tumores 10 pituitários, câncer prostático, câncer retal, câncer de célula renal, retinoblastoma, rabdomyossarcoma, câncer da glândula salivar, câncer de pele, câncer do intestino delgado, sarcoma de tecido mole, tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriais, pineoblastoma, câncer testicular, timoma, carcinoma tímico, câncer da tireóide, câncer de célula 15 transicional da pelvis renal e uretra, câncer uretral, sarcoma uterino, câncer vaginal, câncer vulvar, e tumor de Wilm e outros tumores renais da infância.

9. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o distúrbio proliferativo é um câncer selecionado do grupo que consiste em: sarcomas, câncer da bexiga, câncer ovariano, câncer mamário, 20 câncer cerebral, câncer pancreático, câncer colônico, câncer hematológico, câncer cutâneo, câncer pulmonar, e câncer ósseo.

10. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que o câncer é selecionado de câncer colorretal, carcinoma renal, carcinoma ovariano, carcinoma pancreático, carcinoma prostático, carcinoma 25 mamário, melanoma, glioblastoma, leucemia mielóide aguda, carcinoma de célula pulmonar de célula pequena, carcinoma pulmonar de célula não pequena, rabdomyossarcoma, e carcinoma de célula basal.

11. Uso de um composto como definido na reivindicação 1, ou de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de

ser na fabricação de um medicamento para induzir a apoptose em uma célula.

12. Uso de acordo com a reivindicação 11, caracterizado pelo fato de que a célula é uma célula cancerosa.

5 13. Uso de um composto como definido na reivindicação 1, ou de um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de uma doença autoimune, em que a doença autoimune é uma em que a condição é causada ou exacerbada pela regulação anormal da apoptose, e é selecionada do grupo que consiste em: lúpus eritematoso sistêmico, psoríase, e púrpura
10 trombocitopênica idiopática (*Morbus Werlhof*).

14. Composto, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste em Composto 9, Composto 10, Composto 11, Composto 12, Composto 13, e Composto 15 protegido.

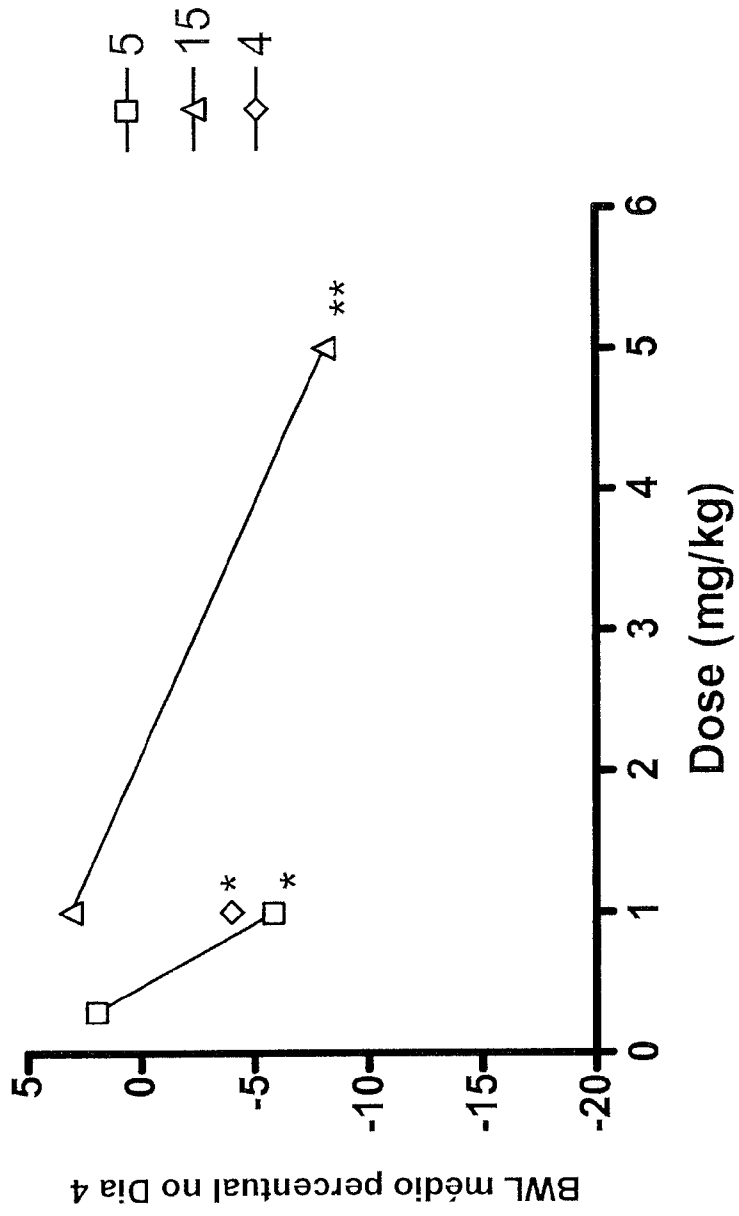
15 15. Composto de acordo com a reivindicação 14, caracterizado pelo fato de que é o Composto 14.

16. Processo para preparar o Composto 15, caracterizado pelo fato de que compreende desproteger um Composto 15 protegido.

17. Processo de acordo com a reivindicação 16, caracterizado pelo fato de que o Composto 15 protegido é o Composto 14.

20 18. Composto, caracterizado pelo fato de que é selecionado do grupo que consiste em Composto 19, Composto 20, Composto 28, Composto 29, Composto 31, e Composto 32.

FIGURA 1

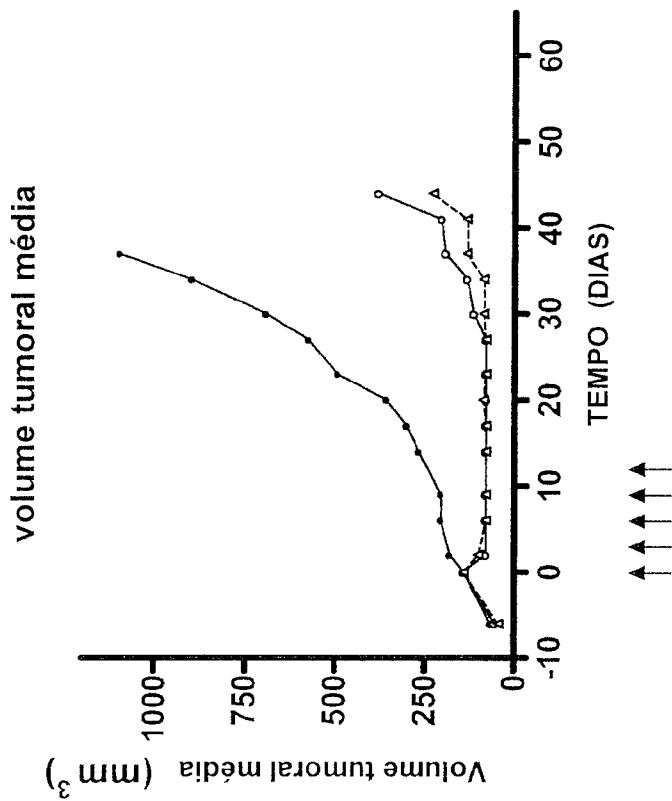


*MORTALIDADE A 3 mg / kg

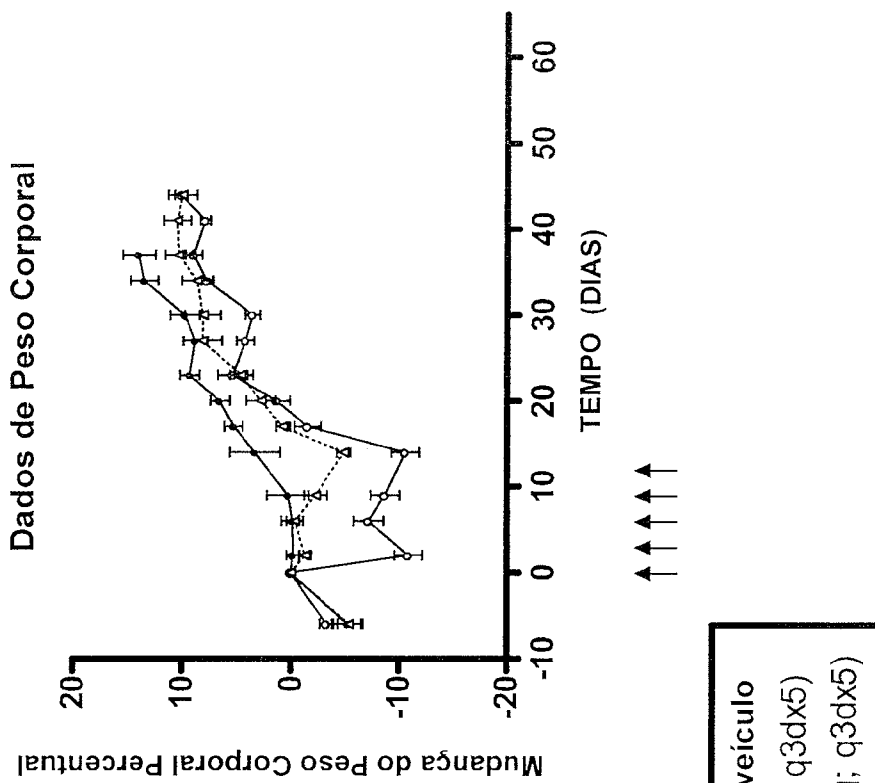
**MORTALIDADE A 10 mg / kg

FIGURA 2

2A



2B



- Controle de veículo
- 5 (15 mg/kg; q3dx5)
- △--- 15 (20 mg/kg; q3dx5)

RESUMO

“COMPOSTO, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, USO DO REFERIDO COMPOSTO, E, PROCESSO PARA PREPARAR UM COMPOSTO”

Um mimético de SMAC e composições farmacêuticas do mesmo e métodos de uso.