

---

(11) Número de Publicação: **PT 1187592 E**

(51) Classificação Internacional:

**A61K 31/506** (2006.01) **C07D 239/48** (2006.01)

**C07D 401/06** (2006.01) **C07D 471/04** (2006.01)

**A61K 31/4375** (2006.01) **A61K 31/55**

(2006.01)

**C07D 519/00** (2006.01) **A61P 19/10** (2006.01)

---

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

---

(22) Data de pedido: **2000.05.30**

(73) Titular(es):

**MERCK & CO. INC.**

**126 EAST LINCOLN AVENUE RAHWAY, NJ**

**07065-0907**

**US**

(30) Prioridade(s): **1999.06.02 US 137101 P**  
**2000.01.31 US 179216 P**

(72) Inventor(es):

**WASYL HALCZENKO**

**US**

**MARK E. DUGGAN**

**US**

**GEORGE D. HARTMAN**

**US**

**ROBERT S. MEISSNER**

**US**

**PAUL J. COLEMAN**

**US**

(43) Data de publicação do pedido: **2002.03.20**

(74) Mandatário:

**ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS**

**PT**

**RUA VICTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA**

(54) Epígrafe: **ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DE INTEGRINA ALFA V**

(57) Resumo:

**RESUMO****"ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DE INTEGRINA ALFA V"**

A presente invenção relaciona-se com novos derivados do ácido nonanóico, com a sua síntese e com a sua utilização como antagonistas  $\alpha v$  dos receptores de integrina. Mais particularmente, os compostos da presente invenção são antagonistas dos receptores de integrina  $\alpha v\beta 3$  e são úteis para inibição da reabsorção óssea, tratamento e prevenção da osteoporose, e inibição da restenose vascular, retinopatia diabética, degeneração macular, angiogéneses, aterosclerose, inflamação, artrite inflamatória, doença viral, cancro e crescimento tumoral metastático.

**DESCRIÇÃO****"ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DE INTEGRINA ALFA V"****ÁREA DA INVENÇÃO**

A presente invenção relaciona-se com derivados do ácido nonanóico, com a sua síntese e com a sua utilização como antagonistas dos receptores de integrina  $\alpha v$ . Mais particularmente, os compostos da presente invenção são antagonistas dos receptores de integrina  $\alpha v\beta 3$ ,  $\alpha v\beta 5$ , e receptores de integrina  $\alpha v$  associados a outras subunidades  $\beta$ , e são úteis para inibição da reabsorção óssea, tratamento e prevenção da osteoporose, e inibição da restenose vascular, retinopatia diabética, degeneração macular, angiogénesis, aterosclerose, inflamação, artrite inflamatória, doença viral, cancro e crescimento tumoral metastático.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

Crê-se que uma grande variedade de doenças e patologias podem ser mediadas por actuação sobre receptores de integrinas e que os antagonistas dos receptores de integrinas representam uma classe de fármacos úteis. Os receptores de integrinas são receptores transmembranares

heterodiméricos através dos quais as células se ligam e comunicam com matrizes extracelulares e outras células. (Ver S. B. Rodan e G. A. Rodan, "Integrin Function In Osteoclasts", *Journal of Endocrinology*, 154:S47-S56 (1997), que aqui é dado como integralmente incorporado por citação).

Num aspecto da presente invenção, os compostos aqui descritos são úteis para inibição da reabsorção óssea. A reabsorção óssea é mediada pela acção de células conhecidas como osteoclastos. Os osteoclastos são células multinucleares grandes com até cerca de 400 mm de diâmetro que reabsorvem tecido mineralizado, sobretudo carbonato de cálcio e fosfato de cálcio, em vertebrados. Os osteoclastos são células capazes de se movimentar activamente que migram ao longo da superfície do osso, e podem ligar-se ao osso, segregar os ácidos e proteases necessários, causando assim real reabsorção de tecido mineralizado do osso. Mais especificamente, crê-se que os osteoclastos existem em pelo menos dois estados fisiológicos, nomeadamente, o estado segregante e o estado móvel ou com motilidade. No estado segregante, os osteoclastos são planos, ligam-se à matriz óssea através de uma zona de fixação forte (zona de selagem), tornam-se altamente polarizados, formam uma borda pregueada, e segregam enzimas lisossomais e protões para reabsorver osso. A adesão de osteoclastos à superfície óssea é um passo inicial importante na reabsorção óssea. No estado migratório ou com motilidade, os osteoclastos migram através da matriz óssea e não tomam parte na reabsorção até se ligarem novamente ao osso.

As integrinas estão envolvidas na fixação, activação e migração dos osteoclastos. A integrina mais abundante nos osteoclastos, e.g., em osteoclastos de rato, galinha, murganho e humanos, é um receptor de integrinas conhecido como  $\alpha v\beta 3$ , que se pensa que interactua no osso com as proteínas da matriz que contêm a sequência RGD. Os anticorpos de  $\alpha v\beta 3$  bloqueiam a reabsorção óssea *in vitro* indicando que esta integrina desempenha um papel chave no processo de reabsorção. Há provas crescentes que sugerem que os ligandos de  $\alpha v\beta 3$  podem ser utilizados para inibir eficazmente a reabsorção óssea mediada por osteoclastos *in vivo* em mamíferos.

As principais doenças ósseas actuais que preocupa o público são a osteoporose, hipercalcemia maligna, osteopenia devida a metástases ósseas, doença periodontica, hiperparatiroidismo, erosões periarticulares na artrite reumatóide, doença de Paget, osteopenia induzida por imobilização e osteoporose induzida por glucocorticóides. Todas estas patologias são caracterizadas por perda de massa óssea, resultando de um desequilíbrio entre a reabsorção óssea, i.e. degradação, e a formação óssea, que continua ao longo da vida a uma taxa de cerca de 14% por ano em média. Contudo, a taxa de renovação óssea difere de sítio para sítio; por exemplo, é mais alta no osso trabecular das vértebras e no osso alveolar dos maxilares do que nos cortexes dos ossos longos. A potencial de perda de massa óssea está directamente relacionado com a

renovação e pode chegar a mais de 5% por ano em vértebras imediatamente após a menopausa, uma patologia que leva a risco acrescido de fracturas.

Nos Estados Unidos, há actualmente cerca de 20 milhões de pessoas com fracturas detectáveis das vértebras devido a osteoporose. Além disso, há cerca de 250.000 fracturas do cólo do fémur atribuídas à osteoporose. Esta situação está associada a uma taxa de mortalidade de 12% nos primeiros dois anos, enquanto que 30% dos doentes requer cuidados numa casa de repouso após a fractura.

Os indivíduos que sofrem de todas as patologias listadas acima beneficiariam de tratamento com agentes que inibem a reabsorção óssea.

Adicionalmente, verificou-se que os ligandos de  $\alpha v \beta 3$  são úteis no tratamento e/ou inibição de restenose (*i.e.* recorrência de estenose após cirurgia correctiva da válvula cardíaca), aterosclerose, retinopatia diabética, degeneração macular, e angiogénesse (*i.e.* formação de novos vasos sanguíneos), e inibição de doença viral. Acresce que foi postulado que o crescimento de tumores depende de um fornecimento adequado de sangue, que por sua vez está dependente do crescimento de novos vasos no tumor; assim, a inibição da angiogénesse pode provocar regressão tumoral em modelos animais (ver *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 12th ed., 1991, que aqui é dado como integralmente incorporado por citação). Portanto, os antagonistas

de  $\alpha v\beta 3$  que inibem a angiogénesse podem ser úteis no tratamento de cancro por inibiçao do crescimento tumoral (ver, e.g., Brooks et al., *Cell*, 79:1157-1164 (1994), que aqui é dado como integralmente incorporado por citação).

Também foram apresentadas provas que sugerem que a angiogénesse é um factor central na iniciação e persistência das doenças artríticas, e que a integrina  $\alpha v\beta 3$  vascular pode ser um alvo preferido na artrite inflamatória. Portanto, os antagonistas de  $\alpha v\beta 3$  que inibem a angiogénesse podem representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento de doenças artríticas, tais como artrite reumatóide (ver C. M. Storgard et al., "Decreased angiogenesis and arthritic disease in rabbits treated with an  $\alpha v\beta 3$  antagonist", *J. Clin. Invest.*, 103:47-54 (1999), que aqui é dado como integralmente incorporado por citação).

Além disso, compostos desta invençao também podem inibir a neovascularização por actuação como antagonistas do receptor de integrina,  $\alpha v\beta 5$ . Demonstrou-se que um anti-corpo monoclonal para  $\alpha v\beta 5$  inibe a angiogénesse induzida por VEGF em córnea de coelho e no modelo da membrana corioalantóica de pinto (ver M. C. Friedlander et al., *Science* 270:1500-1502 (1995), que aqui é dado como integralmente incorporado por citação). Assim, compostos que antagonizam  $\alpha v\beta 5$  são úteis para tratamento e prevençao de degeneração macular, retinopatia diabética, doença viral, cancro e crescimento tumoral metastático.

Adicionalmente, os compostos da presente invenção podem inibir a angiogénesse e inflamação por actuação como antagonistas de receptores de integrina  $\alpha v$  associados a outras subunidades  $\beta$ , tais como  $\alpha v\beta 6$  e  $\alpha v\beta 8$ . (ver, por exemplo, Melpo Christofidou-Solomidou *et al.*, "Expression and Function of Endothelial Cell  $\alpha v$  Integrin Receptors in Wound-Induced Human Angiogenesis in Human Skin/SCID Mice Chimeras", *American Journal of Pathology*, 151:975-83 (1997) e Xiao-Zhu Huang *et al.*, "Inactivation of the Integrin  $\beta 6$  Subunit Gene Reveals a Role of Epithelial Integrins in Regulating Inflammation in the Lungs and Skin", *Journal of Cell Biology*, 133:921-28 (1996), que aqui são dados como integralmente incorporados por citação).

Além disso, certos compostos desta invenção antagonizam tanto os receptores  $\alpha v\beta 3$  como os  $\alpha v\beta 5$ . Estes compostos, referidos como "antagonistas duplos  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ ", são úteis para inibiçao da reabsorção óssea, tratamento e prevençao da osteoporose, e inibiçao da restenose vascular, retinopatia diabética, degeneração macular, angiogénesse, aterosclerose, inflamação, cancro, e crescimento tumoral metastático.

Foram descritos antagonistas peptidílicos bem como antagonistas peptidomiméticos do receptor de integrina  $\alpha v\beta 3$  na literatura científica e de patentes. Por exemplo, faz-se referência a W. J. Hoekstra e B. L. Poulter, *Curr. Med. Chem.* 5:195-204 (1998) e referências aí citadas; WO 95/32710; WO 95/37655; WO 97/01540; WO 97/37655; WO

98/08840; WO 98/18460; WO 98/18461; WO 98/25892; WO 98/31359; WO 98/30542; WO 99/15506; WO 99/15507; WO 99/31061; WO 00/06169; EP 853084; EP 854140; EP 854145; patente US Nº 5 780 426; e patente US Nº 6 048 861. Foram apresentadas provas da capacidade dos antagonistas dos receptores de integrina  $\alpha v\beta 3$  para impedir a reabsorção óssea *in vitro* e *in vivo* (ver V. W. Engleman *et al.*, "A Peptidomimetic Antagonist of the  $\alpha v\beta 3$  Integrin Inhibits Bone Resorption *in Vitro* and Prevents Osteoporosis *in Vivo*", *J. Clin. Invest.* 99:2284-2292 (1997); S. B. Rodan *et al.*, "A High Affinity Non-Peptide  $\alpha v\beta 3$  Ligand Inhibits Osteoclast Activity *In Vitro* and *In Vivo*", *J. Bone Miner. Res.* 11:S289 (1996); J. F. Gourvest *et al.*, "Prevention of OVX-Induced Bone Loss With a Non-peptidic Ligand of the  $\alpha v\beta 3$  Vitronectin Receptor", *Bone* 23:S612 (1998); M. W. Lark *et al.*, "An Orally Active Vitronectin Receptor  $\alpha v\beta 3$  Antagonist Prevents Bone Resorption *In Vitro* and *In Vivo* in the Ovariectomized Rat", *Bone* 23:S219 (1998)).

O receptor de integrina  $\alpha v\beta 3$  reconhece a sequência tripeptídica Arg-Gly-Asp (RGD) na sua matriz mãe e glicoproteínas da superfície celular (ver J. Samanen *et al.*, "Vascular Indications for Integrin  $\alpha v$  Antagonists", *Curr. Pharmaceut. Design* 3:545-584 (1997)). Um núcleo de benzazepina foi utilizado entre outros pela Genentech e SmithKline Beecham como um mimético de Gly-Asp conformativamente impedido para elaborar antagonistas não peptídicos do receptor de integrina  $\alpha v\beta 3$  substituídos no terminal N com miméticos de arginina heterocíclicos (ver R.

M. Keenan et al., "Discovery of Potent Nonpeptide Vitronectin Receptor ( $\alpha\beta 3$ ) Antagonists", *J. Med. Chem.* 40:2289-2292 (1997); R. M. Keenan et al., "Benzimidazole Derivatives As Arginine Mimetics in 1,4-Benzodiazepine Nonpeptide Vitronectin Receptor ( $\alpha\beta 3$ ) Antagonists", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:3165-3170 (1998); e R. M. Keenan et al., "Discovery of an Imidazopyridine-Containing 1,4-Benzodiazepine Nonpeptide Vitronectin Receptor ( $\alpha\beta 3$ ) Antagonist With Efficacy in a Restenosis Model", *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 8:3171-3176 (1998). Patentes atribuídas a SmithKline Beecham que descrevem esses receptores de integrinas  $\alpha\beta 3$  benzazepinas, bem como benzodiazepinas e benzociclo-heptenos relacionados, incluem o WO 96/00574, WO 96/00730, WO 96/06087, WO 96/26190, WO 97/24119, WO 97/24122, WO 97/24124, WO 98/15278, WO 99/05107, WO 99/06049, WO 99/15170, and WO 99/15178, e à Genentech incluem o WO 97/34865. O núcleo de dibenzociclo-hepteno, bem como de dibenzoxazepina, também tem sido utilizado como mimético de Gly-Asp para dar antagonistas de  $\alpha\beta 3$  (ver WO 97/01540, WO 98/30542, WO 99/11626 e WO 99/15508. todas atribuídas a SmithKline Beecham).

Outros antagonistas de receptores de integrina que têm restrições conformacionais a nível do anel do esqueleto foram descritos no WO 98/08840; WO 99/30709; WO 99/30713; WO 99/31099; WO 00/09503; patente U.S. N° 5 919 792; patente U.S. N° 5 925 655; patente U.S. N° 5 981 546; e patente US N° No. 6 017 926.

Contudo, persiste ainda a necessidade de antagonistas de receptores de integrina com molécula pequena, não peptídicos e selectivos que apresentem potência e propriedades farmacodinâmicas e farmacocinéticas melhoradas, tais como biodisponibilidade oral e duração de acção, em relação a compostos já descritos. Esses compostos demonstrariam ser úteis no tratamento, prevenção ou supressão de várias patologias enumeradas acima que são mediadas pela ligação a receptores de integrina  $\alpha\beta$  e por adesão e activação celulares.

Na patente U.S. Nº 6 048 861 (11 de Abril de 2000), descrevemos, *inter alia*, uma série de derivados do ácido nonanóico 3-substituídos que são antagonistas potentes do receptor de integrina  $\alpha\beta3$ . Na presente invenção, descrevemos derivados de ácido alcanóicos análogos que estão substituídos na posição C-5 ou C-7 da cadeia alifática com uma funcionalidade oxigénio, tal como hidroxilo e ceto, e na posição C-3 com um grupo arilo opcionalmente substituído. Quando comparados com os compostos mãe, os compostos de cadeia oxigenada da presente invenção são menos hidrófobos, apresentam ligação diminuída às proteínas do plasma e apresentam propriedades farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas superiores *in vivo*.

É portanto um objecto da presente invenção proporcionar novos derivados do ácido nonanóico oxigenados na posição C-5 ou C-7 da cadeia alifática que são úteis como antagonistas dos receptores de integrina.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar novos derivados do ácido nonanóico oxigenados na posição C-5 ou C-7 da cadeia alifática que são úteis como antagonistas dos receptores  $\alpha v\beta 3$ .

Outro objecto da presente invenção é proporcionar novos derivados do ácido nonanóico oxigenados na posição C-5 ou C-7 da cadeia alifática que são úteis como antagonistas dos receptores  $\alpha v\beta 5$ .

Outro objecto da presente invenção é proporcionar novos derivados do ácido nonanóico oxigenados na posição C-5 ou C-7 da cadeia alifática que são úteis como antagonistas duplos dos receptores  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ .

Outro objecto da presente invenção é proporcionar composições farmacêuticas compreendendo antagonistas dos receptores de integrina.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar métodos para a preparação das composições farmacêuticas da presente invenção.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar métodos para suscitar um efeito antagonista num receptor de integrinas num mamífero dele necessitado por administração dos compostos e composições farmacêuticas da presente invenção.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar compostos e composições farmacêuticas úteis para inibição da reabsorção óssea, restenose, ateroscleroze, inflamação, artrite inflamatória, doença viral, retinopatia diabética, degeneração macular, angiogénesis, cancro, e crescimento tumoral metastático.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar compostos e composições farmacêuticas úteis para tratamento da osteoporose.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar métodos para inibição da reabsorção óssea, restenose, ateroscleroze, inflamação, artrite inflamatória, doença viral, retinopatia diabética, degeneração macular, angiogénesis, cancro e crescimento tumoral metastático.

Outro objecto da presente invenção é proporcionar métodos para tratamento da osteoporose.

Estes e outros objectos tornar-se-ão prontamente evidentes a partir da descrição pormenorizada que se segue.

#### **SUMÁRIO DA INVENÇÃO**

A presente invenção relaciona-se com compostos novos tal como descritos na reivindicação 1.

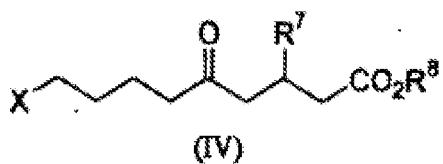
Os compostos da presente invenção são úteis como antagonistas dos receptores de integrinas  $\alpha v$ .

A presente invenção também se relaciona com composições farmacêuticas compreendendo os compostos da presente invenção e um veículo farmaceuticamente aceitável.

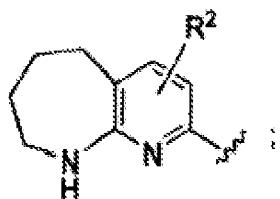
A presente invenção também se relaciona com métodos para a preparação das composições farmacêuticas da presente invenção.

**DESCRIÇÃO PORMENORIZADA DA INVENÇÃO**

A presente invenção é dirigida a novos derivados do ácido nonanóico descritos pela fórmula estrutural (IV)



ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que X é



R<sup>2</sup> é seleccionado do grupo que consiste em halogéneo, C<sub>1-8</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>3-8</sub> ciclo-heteroalquilo, C<sub>3-8</sub>

cicloalquil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> ciclo-heteroalquil-C<sub>1-6</sub> alquilo, arilo, aril-C<sub>1-6</sub> alquilo, amino, C<sub>1-3</sub> acilamino, C<sub>1-3</sub> acilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, amino-C<sub>1-6</sub> alquilo, (C<sub>1-6</sub> alquil)<sub>1-2</sub> amino, C<sub>3-6</sub> cicloalquil-C<sub>0-2</sub> amino, (C<sub>1-6</sub> alquil)<sub>1-2</sub> amino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-6</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alcoxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxcarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxcarbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxilo, hidroxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, nitro, ciano, trifluorometilo, trifluorometoxi, trifluoroetoxi, C<sub>1-8</sub> alquil-S(O)<sub>0-2</sub>, (C<sub>1-8</sub> alquil)<sub>0-2</sub> aminocarbonilo, C<sub>1-8</sub> alquloxcarbonilamino, (C<sub>1-8</sub> alquil)<sub>1-2</sub> aminocarboniloxi, (aril-C<sub>1-3</sub> alquil)<sub>1-2</sub> amino, (aril)<sub>1-2</sub> amino, aril-C<sub>1-3</sub> alquilsulfonilamino e C<sub>1-8</sub> alquilsulfonilamino; R<sup>7</sup> é arilo em que o grupo arilo é seleccionado do grupo que consiste em

- (1) fenilo,
- (2) naftilo,
- (3) piridilo,
- (4) furilo,
- (5) tienilo,
- (6) pirrolilo,
- (7) oxazolilo,
- (8) tiazolilo,
- (9) imidazolilo,
- (10) pirazolilo,
- (11) isoxazolilo,
- (12) isotiazolilo,
- (13) pirimidinilo,

- (14) pirazinilo,
- (15) piridazinilo,
- (16) tetrazolilo,
- (17) quinolilo,
- (18) isoquinolilo,
- (19) benzimidazolilo,
- (20) benzofurilo,
- (21) benzotienilo,
- (22) indolilo,
- (23) benzotiazolilo,
- (24) benzoxazolilo,
- (25) di-hidrobenzofurilo,
- (26) benzo(1,3)dioxolanilo,
- (27) benzo(1,4)dioxanilo,
- (28) quinazolilo,
- (29) quinoxalilo, e
- (30) 3,4-di-hidro-2H-1,4-dioxa-5-aza-naftalenilo;

em que o grupo arilo como definido acima nos itens (1) a (30) está não substituído ou substituído com um a três substituintes seleccionados independentemente de hidroxilo, hidroxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, halogéneo, C<sub>1-8</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> ciclo-alquilo, arilo, aril-C<sub>1-3</sub> alquilo, amino, amino C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-3</sub> acilamino, C<sub>1-3</sub> acilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-6</sub> alquilamino, di(C<sub>1-6</sub>)alquilamino, C<sub>1-6</sub> alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, di(C<sub>1-6</sub>)alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-4</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alquistio, C<sub>1-4</sub> alquilsulfônico, C<sub>1-4</sub> alquilsulfônico, C<sub>1-4</sub> alcoxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonilo, hidroxicarbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> alcoxicarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxicarbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> al-

quilcarboniloxi, ciano, trifluorometilo, 1,1,1-trifluoroetilo, trifluorometoxi, trifluoroetoxi e nitro; ou dois substituintes adjacentes conjuntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados unem-se para formar um anel com cinco ou seis membros saturado ou insaturado contendo 1 ou 2 heteroátomos seleccionados do grupo que consiste em N, O e S, cujos átomos de carbono do anel podem estar substituídos com oxo ou C<sub>1-3</sub> alquilo; com a condição de que se X é 5,6,7,8-tetra-hidro[1,8]naftiridin-2-ilo, R<sup>2</sup> é hidrogénio e arilo é piridin-3-ilo 6-substituído, em que o 6-substituinte no anel de piridin-3-ilo é diferente de metoxi; e R<sup>8</sup> é hidrogénio ou C<sub>1-3</sub> alquilo.

Numa forma de realização, R<sup>7</sup> é arilo em que o grupo arilo é seleccionado do grupo que consiste em fenilo, piridilo, quinolilo, pirimidinilo, pirazinilo, piridazinilo, pirazolilo, benzofurilo, di-hidrobenzofurilo e 3,4-di-hidro-2H-1,4-dioxa-5-aza-naftalenilo, em que o grupo arilo está não substituído ou substituído com um a dois substituintes tal como definidos acima.

Noutra classe desta forma de realização, R<sup>7</sup> é quinolilo, piridilo ou pirimidinilo, não substituído ou substituído com um a dois substituintes seleccionados independentemente de halogéneo, fenilo, C<sub>1-4</sub> alquilo, C<sub>3-6</sub> cicloalquilo, C<sub>1-3</sub> alcoxi, amino, C<sub>1-3</sub> alquilamino, di(C<sub>1-3</sub>) alquilamino, hidroxilo, ciano, trifluorometilo, 1,1,1-trifluoroetilo, trifluorometoxi e trifluoroetoxi.

Numa subclasse desta classe,  $R^2$  é seleccionado do grupo que consiste em

hidrogénio,

halogéneo,

amino,

$C_{1-4}$  alquilamino,

$C_{3-6}$  cicloalquil- $C_{0-2}$  alquilamino

ciano,

$C_{1-4}$  alquilo,

ciclopropilo,

aril  $C_{1-3}$  alquilo,

$C_{1-4}$  acilamino,

$C_{1-4}$  alcoxi,

$C_{1-4}$  alquistio,

aminocarbonilo,

( $C_{1-6}$  alquil) $_{1-2}$  aminocarbonilo,

$C_{1-4}$  alcoxcarbonilo,

trifluorometilo e

trifluorometoxi.

Numa subclasse adicional desta classe,  $R^2$  é seleccionados do grupo que consiste em

hidrogénio,

halogéneo,

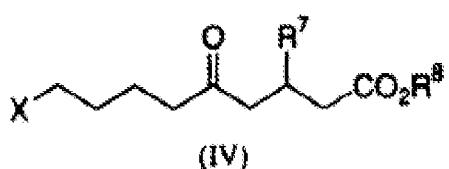
amino,

$C_{1-3}$  alquilamino,

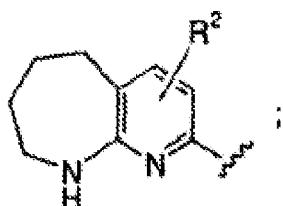
$C_{3-6}$  cicloalquilmetilamino,

C<sub>1-4</sub> alquilo,  
ciclopropilo,  
trifluorometilo e  
trifluorometoxi.

Outra forma de realização é dirigida a compostos de fórmula estrutural (IV):



ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que X é:



R<sup>2</sup> é hidrogénio, C<sub>1-4</sub> alquilo ou ciclopropilo

R<sup>7</sup> é quinolilo, piridilo ou pirimidinilo, não substituído ou substituído com um substituinte seleccionado de C<sub>1-4</sub> alquilo, C<sub>3-6</sub> cicloalquilo, C<sub>1-3</sub> alcoxi, amino, C<sub>1-3</sub> alquil-amino, di(C<sub>1-3</sub>) alquilamino, ciano, trifluorometilo ou trifluorometoxi, e

R<sup>8</sup> é hidrogénio ou C<sub>1-3</sub> alquilo.

Formas de realização adicionais da presente invenção são dirigidas a compostos de fórmula IV em que R<sup>8</sup> é hidrogénio.

Exemplos ilustrativos mas não limitativos de compostos da presente invenção que são úteis como antagonistas de receptores de integrina αv são os seguintes:

Ácido 3-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-te-tra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-te-tra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

Para utilização em medicina, os sais dos compostos desta invenção referem-se a "saís farmaceuticamente aceitáveis" não tóxicos. Contudo, outros saís podem ser úteis na preparação dos compostos de acordo com a invenção ou dos seus saís farmaceuticamente aceitáveis. Os saís abrangidos no termo "saís farmaceuticamente aceitáveis" referem-se a saís não tóxicos dos compostos desta invenção que são genericamente preparados por reacção da base livre com um ácido orgânico ou inorgânico adequado. Saís representativos incluem os seguintes: acetato, benzenossulfonato, benzoato, bicarbonato, bissulfato, bitartarato, borato, brometo, de cálcio, camsilato, carbonato, cloreto,

clavulanato, citrato, dicloridrato, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, gluceptato, gluconato, glutamato, glicolilarsanilato, hexilresorcinato, de hidrabamina, bromidrato, cloridrato, hidroxinaftoato, iodeto, isotionato, lactato, lactobionato, laurato, malato, maleato, mandelato, mesilato, metilbrometo, metilnitrato, metilsulfato, mucato, napsilato, nitrato, sal de amónio de N-metilglucamina, oleato, oxalato, pamoato (embonato), palmitato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalacturonato, salicilato, estearato, sulfato, subacetato, succinato, tanato, tartarato, teoclato, tosilato, trietiodeto e valerato. Além disso, quando os compostos da invenção têm uma unidade ácido, os seus sais farmaceuticamente aceitáveis podem incluir sais de metais alcalinos, e.g., sais de sódio ou de potássio, sais de metais alcalino terrosos, e.g., sais de cálcio ou de magnésio; e sais formados com ligandos orgânicos adequados, e.g., sais de amónio quaternário.

Os compostos da presente invenção podem ter centros quirais e podem por isso ocorrer como racematos, misturas racémicas, enantiómeros individuais, misturas diastereoméricas e diastereómeros individuais, estando todas as formas isoméricas incluídas na presente invenção. Assim, quando um composto é quiral, os enantiómeros ou diastereómeros separados, substancialmente isentos um do outro, estão incluídos no âmbito da invenção; estão ainda incluídas todas as misturas dos dois enantiómeros.

Alguns dos compostos aqui descritos contêm

ligações duplas olefínicas e, salvo indicação em contrário, pretendem incluir tanto os isómeros geométricos E como Z.

Alguns dos compostos aqui descritos podem existir com diferentes pontos de ligação do hidrogénio, referidos como tautómeros. Um desses exemplos pode ser uma cetona e a sua forma enólica, conhecidos como tautómeros ceto-enólicos. Os tautómeros individuais bem como as suas misturas estão abrangidos nos compostos da presente invenção.

Os compostos da presente invenção podem ser separados em pares diastereoisoméricos de enantiómeros, por exemplo, por cristalização fraccionada de um solvente adequado, por exemplo, metanol ou acetato de etilo ou uma sua mistura. O par de enantiómeros assim obtido pode ser separado nos estereoisómeros individuais por meios convencionais, por exemplo, por utilização de um ácido opticamente activo como agente de resolução, ou por HPLC utilizando uma fase estacionária quiral. Alternativamente, qualquer enantiómero de um composto da presente invenção pode ser obtido por síntese estereoespecífica utilizando materiais de partida ou reagentes opticamente puros com configuração conhecida.

No âmbito da invenção também estão incluídos polimorfos e hidratos dos compostos da presente invenção.

A presente invenção inclui no seu âmbito pró-fármacos dos compostos desta invenção. Em geral, esses pró-

fármacos serão derivados funcionais dos compostos desta invenção que podem ser prontamente convertidos *in vivo* no composto necessário. Assim, nos métodos de tratamento da presente invenção, o termo "administração" vai abranger o tratamento de várias patologias descritas com o composto especificamente descrito ou com um composto que pode não ser especificamente descrito, mas que se converte no composto especificado *in vivo* após a administração ao doente. Os procedimentos convencionais para a selecção e preparação de derivados pró-fármacos adequados estão descritos, por exemplo, em "Design of Prodrugs," ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985, que aqui é dado como integralmente incorporado por citação. Os metabolitos destes compostos incluem espécies activas produzidas por introdução de compostos desta invenção no meio biológico.

O termo "quantidade terapeuticamente eficaz" significa a quantidade de um fármaco ou agente farmacêutico que vai induzir a resposta biológica ou médica de um tecido, sistema, animal ou ser humano que é procurada por um investigador ou por um médico.

O termo "antagonista de receptores de integrina", tal como aqui utilizado, refere-se a um composto que se liga a e antagoniza o receptor  $\alpha v\beta 3$  ou o receptor  $\alpha v\beta 5$ , ou um composto que se liga a e antagoniza uma combinação destes receptores (por exemplo, um antagonista duplo de receptores  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ ).

O termo "reabsorção óssea", tal como aqui utilizado, refere-se ao processo através do qual os osteoclastos degradam o osso.

O termo "alquilo" significa alcanos de cadeia linear ou ramificada com um total de um a dez átomos de carbono, ou qualquer número dentro desta gama (*i.e.*, metilo, etilo, 1-propilo, 2-propilo, n-butilo, s-butilo, t-butilo, etc.).

O termo "alcenilo" significa alcenos de cadeia linear ou ramificada com um total de dois a dez átomos de carbono, ou qualquer número dentro desta gama.

O termo "alcinilo" significa alcinos de cadeia linear ou ramificada com um total de dois a dez átomos de carbono, ou qualquer número dentro desta gama.

O termo "cicloalquilo" significa anéis cílicos de alcanos com um total de três a oito átomos de carbono, ou qualquer número dentro desta gama (*i.e.*, ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo, ciclo-hexilo, ciclo-heptilo ou ciclooctilo).

O termo "ciclo-heteroalquilo", tal como aqui utilizado, significa um anel heterocíclico completamente saturado com 3 a 8 membros contendo um ou dois heteroátomos seleccionados de N, O ou S. Exemplos de grupos ciclo-heteroalquilo incluem, mas não estão limitados a

piperidinilo, pirrolidinilo, azetidinilo, morfolinilo e piperazinilo.

O termo "alcoxi", tal como aqui utilizado, refere-se a alcóxidos de cadeia linear ou ramificada com o número de átomos de carbono especificado (*e.g.*, C<sub>1-5</sub> alcoxi), ou qualquer número dentro desta gama (*i.e.*, metoxi, etoxi, etc.).

O termo "arilo", tal como aqui utilizado, refere-se a um sistema monocíclico ou bicíclico compreendendo pelo menos um anel aromático, em que o sistema monocíclico ou bicíclico contém 0, 1, 2, 3 ou 4 heteroátomos seleccionados de N, O ou S, e em que o sistema monocíclico ou bicíclico está não substituído ou substituído com um ou mais grupos seleccionados independentemente de halogéneo, C<sub>1-8</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, arilo, arilo C<sub>1-3</sub> alquilo, amino, amino C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-3</sub> acilamino, C<sub>1-3</sub> acilamino C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-6</sub> alquilamino, C<sub>1-6</sub> alquilamino C<sub>1-6</sub> alquilo, di(C<sub>1-6</sub>) alquil-amino, di(C<sub>1-6</sub>) alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-4</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alquiltio, C<sub>1-4</sub> alquilsulfônico, C<sub>1-4</sub> alcoxi C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonilo, hidroxicarbonil C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> alcoxycarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxycarbonil C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonil C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxilo, hidroxi C<sub>1-6</sub> alquilo, ciano, trifluorometilo, trifluorometoxi, oxo, e C<sub>1-5</sub> alquilcarboniloxi. Exemplos de arilo incluem, mas não estão limitados a fenilo, naftilo, piridilo, pirrolilo, pirazolilo, pirazinilo, pirimidinilo, imidazolilo, benzimidazolilo, benzotiazolilo, benzoxazolilo, quinolilo, isoqui-

nolilo, quinazolilo, quinoxalilo, indolilo, tienilo, furilo, benzofurilo, di-hidrobenzofurilo, benzotienilo, benzo-(1,3)dioxolanilo, benzo(1,4)dioxanilo, oxazolilo, isoxazolilo, tiazolilo, isotiazolilo e tetrazolilo, que estão não substituídos ou substituídos com um ou mais grupos seleccionados independentemente de halogéneo, C<sub>1-8</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, arilo, aril C<sub>1-3</sub> alquilo, amino, amino C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-3</sub> acilamino, C<sub>1-3</sub> acilamino C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-6</sub> alquilamino, C<sub>1-6</sub> alquilamino C<sub>1-6</sub> alquilo, di(C<sub>1-6</sub>) alquil-amino, di(C<sub>1-6</sub>) alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-4</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alquiltio, C<sub>1-4</sub> alquilsulfinilo, C<sub>1-4</sub> alquilsulfonilo, C<sub>1-4</sub> alcoxi C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonilo, hidroxicarbonil C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> alcoxcarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxcarbonil C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxcarbonil C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxilo, hidroxi C<sub>1-6</sub> alquilo, ciano, trifluorometilo, trifluorometoxi, oxo, e C<sub>1-5</sub> alquilcarboniloxi. Preferencialmente, o grupo arilo está não substituído, mono-, di- ou tri-substituído com um a três dos substituintes acima referidos; mas preferencialmente, o grupo arilo está não substituído, mono- ou di-substituído com um a dois dos substituintes acima referidos.

Sempre que o termo "alquilo" ou "arilo" ou qualquer das raízes dos seus prefixos surge num nome de um substituinte (e.g., aril C<sub>0-8</sub> alquilo), será interpretado como incluindo as limitações indicadas acima para "alquilo" e "arilo". Os números de átomos de carbono designados (e.g., C<sub>1-8</sub>) refere-se independentemente ao número de átomos de carbono numa unidade alquilo ou alquilo cílico ou à

porção alquilo de um substituinte maior em que alquilo surge na raiz do seu prefixo.

Os termos "arilalquilo" e "alquilarilo" incluem uma porção alquilo em que alquilo é como definido acima e que incluem uma porção arilo em que arilo é como definido acima. Exemplos de arilalquilo incluem, mas não estão limitados a benzilo, fluorobenzilo, clorobenzilo, feniletilo, fenilpropilo, fluorofeniletilo, clorofeniletilo, tienilmetilo, tieniletilo e tienilpropilo. Exemplos de alquilarilo incluem, mas não estão limitados a tolueno, etilbenzeno, propilbenzeno, metilpiridina, etilpiridina, propilpiridina e butilpiridina.

Nos compostos da presente invenção, dois substituintes R<sup>2</sup>, quando no mesmo átomo de carbono, podem ser tomados conjuntamente com o átomo de carbono ao qual estão ligados para formar um grupo carbonilo.

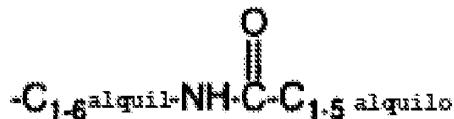
O termo "halogéneo" inclui iodo, bromo, cloro e flúor.

O termo "oxi" significa um átomo de oxigénio (O). O termo "tio" significa um átomo de enxofre (S). O termo "oxo" significa "=O". O termo "carbonilo" significa "C=O".

O termo "substituído" será considerado como incluindo múltiplos graus de substituição por um substituinte designado. Quando são descritas ou reivindicadas

unidades com múltiplos substituintes, o composto substituído pode estar substituído independentemente por uma ou mais das unidades substituintes reivindicadas, uma vez ou várias vezes. Por substituído independentemente, significa que os (dois ou mais) substituintes podem ser iguais ou diferentes.

Na nomenclatura corrente utilizada ao longo desta especificação, a porção terminal da cadeia lateral designada é descrita primeiro, seguida pela funcionalidade adjacente na direcção do ponto de ligação. Por exemplo, um substituinte  $C_{1-5}$  alquilcarbonilamino  $C_{1-6}$  alquilo é equivalente a



Na escolha de compostos da presente invenção, uma pessoa com conhecimentos correntes da matéria saberá que os vários substituintes, i.e. X, R<sup>7</sup> e R<sup>8</sup>, são seleccionados em conformidade com princípios bem conhecidos de conectividade de estruturas químicas.

Compostos representativos da presente invenção tipicamente apresentam afinidade submicromolar para os receptores de integrinas  $\alpha v$ , particularmente os receptores  $\alpha v\beta 3$  e  $\alpha v\beta 5$ . Os compostos desta invenção são portanto úteis para tratamento de mamíferos que sofrem de uma patologia óssea causada ou mediada por reabsorção óssea aumentada,

que estão necessitados dessa terapêutica. Quantidades farmacologicamente eficazes dos compostos, incluindo os seus sais farmaceuticamente aceitáveis, são administrados ao mamífero, para inibir a actividade de osteoclastos de mamíferos.

Os compostos da presente invenção são administrados em dosagens eficazes para antagonizar o receptor  $\alpha v \beta 3$  quando esse tratamento é necessário, como por exemplo na prevenção ou tratamento da osteoporose.

Ilustrativo da invenção é o método em que o efeito antagonista do receptor de integrina  $\alpha v$  é um efeito antagonista de  $\alpha v \beta 3$ . Mais particularmente, o efeito antagonista de  $\alpha v \beta 3$  é seleccionado da inibição de: reabsorção óssea, restenose, angiogénesis, retinopatia diabética, degeneração macular, inflamação, artrite inflamatória, doença viral, cancro e crescimento tumoral metastático. Numa forma de realização do método, o efeito antagonista de  $\alpha v \beta 3$  é a inibição da reabsorção óssea.

Outro exemplo da invenção é o método em que o efeito antagonista de receptores de integrina  $\alpha v$  é um efeito antagonista de  $\alpha v \beta 5$ . Mais especificamente, o efeito antagonista de  $\alpha v \beta 5$  é seleccionado da inibição de restenose, angiogénesis, retinopatia diabética, degeneração macular, inflamação, cancro e desenvolvimento de tumores metastáticos

A invenção é adicionalmente ilustrada pelo método em que o efeito antagonista do receptor integrina  $\alpha v$  é um efeito antagonista duplo  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$ . Mais particularmente, o efeito antagonista duplo  $\alpha v\beta 3/\alpha v\beta 5$  é seleccionado da inibição de: reabsorção óssea, restenose, angiogénesis, retinopatia diabética, degeneração macular, inflamação, doença viral, cancro e desenvolvimento de tumores metástaticos.

Mais particularmente ilustrativa da invenção é uma composição farmacêutica que compreende qualquer dos compostos descritos acima e um veículo farmaceuticamente aceitável. Outro exemplo da invenção é uma composição farmacêutica preparada por combinação de qualquer dos compostos descritos acima e um veículo farmaceuticamente aceitável. Outra ilustração da invenção é um processo para a preparação de uma composição farmacêutica combinando qualquer dos compostos descritos acima e um veículo farmaceuticamente aceitável. Outra ilustração da invenção é um processo para a preparação de uma composição farmacêutica compreendendo a combinação de qualquer dos compostos descritos acima e um veículo farmaceuticamente aceitável.

Adicionalmente ilustrativo da invenção é um método de tratamento e/ou prevenção de uma patologia mediada por antagonismo de um receptor de integrina  $\alpha v$  num mamífero dele necessitado, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer dos compostos descritos acima. Preferencialmente,

a patologia é seleccionada de reabsorção óssea, osteoporose, restenose, retinopatia diabética, degeneração macular, angiogénese, aterosclerose, inflamação, artrite inflamatória, doença viral, cancro, crescimento neoplásico e metástase. Mais preferencialmente, a patologia é seleccionada de osteoporose e cancro. Mais preferencialmente ainda, a patologia é osteoporose.

Mais especificamente ilustrativo da invenção é um método de indução de um efeito antagonista de integrina num mamífero dele necessitado, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer dos compostos ou qualquer das composições farmacêuticas descritos acima. Preferencialmente, o efeito antagonista de integrinas é um efeito antagonista de  $\alpha v \beta 3$ ; mais especificamente, o efeito antagonista de  $\alpha v \beta 3$  é seleccionado da inibição de reabsorção óssea, inibição de restenose, inibição de aterosclerose, inibição de angiogénese, inibição de retinopatia diabética, inibição de degeneração macular, inibição de inflamação, inibição de doença viral e inibição de cancro ou crescimento tumoral metastático. Mais preferencialmente ainda, o efeito antagonista de  $\alpha v \beta 3$  é a inibição da reabsorção óssea. Alternativamente, o efeito antagonista de integrinas é um efeito antagonista de  $\alpha v \beta 5$  ou um efeito antagonista duplo de  $\alpha v \beta 3/\alpha v \beta 5$ . Exemplos de efeitos antagonistas de  $\alpha v \beta 5$  são inibição de restenose, aterosclerose, angiogénese, retinopatia diabética, degeneração macular, inflamação, doença viral e crescimento tumoral metastático.

Exemplos adicionais da invenção são métodos de inibição da reabsorção óssea e de tratamento e/ou prevenção da osteoporose num mamífero deles necessitado, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer dos compostos ou de qualquer das composições farmacêuticas descritos acima.

Ilustrações adicionais da invenção são métodos de tratamento de hipercalcemia maligna, osteopenia devida a metástases ósseas, doença periodônica, hiperparatiroidismo, erosões periarticulares na artrite reumatóide, doença de Paget, osteopenia induzida por imobilização e tratamento com glucocorticóides num mamífero dele necessário, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz de qualquer dos compostos ou de qualquer das composições farmacêuticas descritas acima.

Mais particularmente exemplificativa da invenção é a utilização de qualquer dos compostos descritos acima na preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção de osteoporose num mamífero deles necessitado. Adicionalmente exemplificativa da invenção é a utilização de qualquer dos compostos descritos acima na preparação de um medicamento para o tratamento e/ou prevenção da reabsorção óssea, crescimento neoplásico, cancro, restenose, aterosclerose, retinopatia diabética, degeneração macular, inflamação, artrite inflamatória, doença viral e/ou angiogénesse.

Também exemplificativas da invenção são composições compreendendo ainda uma substância activa seleccionada do grupo que consiste em:

- a) um bisfosfonato orgânico ou um seu sal ou éster farmaceuticamente aceitável,
- b) um modulador do receptor estrogénico,
- c) um modulador do receptor androgénico,
- d) um agente citotóxico/antiproliferativo,
- e) um inibidor de metaloproteinase da matriz,
- f) um inibidor dos factores de crescimento derivados das células da epiderme, derivados de fibroblastos ou derivados de plaquetas,
- g) um inibidor de VEGF,
- h) um anticorpo dirigido contra um factor de crescimento ou de receptor de factor de crescimento,
- i) um inibidor de Flk-1/KDR, Flt-1, Tck/Tie-2 ou Tie-1,
- j) um inibidor de catepsina K,
- k) um secretagogo da hormona do crescimento,
- l) um inibidor da bomba ATPase de protões dos osteoclastos,
- m) um inibidor de activador de plasminogénio do tipo da uroquinase (u-PA),
- n) uma proteína de fusão de anticorpo-interleucina 2 específica de tumores,
- o) um inibidor da HMG-CoA redutase, e
- p) um inibidor da prenilação, tal como um inibidor de farnesil transferase ou um inibidor de geranilgeranil transferase ou um inibidor duplo de farnesil/geranil-geranil transferase;

e as suas misturas. (Ver, B. Millauer et al., "Dominant-Negative Inhibition of Flk-1 Suppresses the Growth of Many Tumor Types in Vivo", *Cancer Research*, **56**, 1615-1620 (1996), que aqui é dado como integralmente incorporado por citação).

Preferencialmente, a substância activa é selecionada do grupo que consiste em:

- a) um bisfosfonato orgânico ou um seu sal ou éster farmaceuticamente aceitável,
- b) um modulador do receptor estrogénico,
- c) um modulador do receptor androgénico,
- d) um inibidor da bomba ATPase de protões dos osteoclastos,
- e) um inibidor da HMG-CoA redutase, e
- f) um inibidor de catepsina K;

e as suas misturas.

Exemplos não limitativos desses bisfosfonatos incluem alendronato, etidronato, pamidronato, risedronato, ibandronato e os seus sais e ésteres farmaceuticamente aceitáveis. Um bisfosfonato particularmente preferido é alendronato, especialmente tri-hidrato de alendronato monossódico.

Exemplos não limitativos de moduladores de

receptores de estrogénios incluem estrogénio, progesterina, estradiol, droloxifeno, raloxifeno e tamoxifeno.

Exemplos não limitativos de agentes citotóxicos/antiproliferativos são taxol, vincristina, vinblastina e doxorrubicina.

A catepsina K, anteriormente conhecida como catepsina O2, é uma cisteína protease e está descrita na publicação do pedido internacional PCT Nº WO 96/13523, publicado em 9 de Maio de 1996; patente U.S. Nº 5 501 969, pedida em 3 de Março de 1996; e patente U.S. Nº 5 736 357, pedida em 7 de Abril de 1998, de que todos são aqui dados como integralmente incorporados por citação. As cisteína proteases, especificamente as catepsinas, estão ligadas a vários estados patológicos, tais como metástases tumorais, inflamação, artrite e remodelagem óssea. A pH ácido, as catepsinas podem degradar o colagénio de tipo I. Os inibidores de catepsina proteases podem inibir a reabsorção óssea osteoclastica por inibição da degradação das fibras de colagénio e são por isso úteis no tratamento de doenças da reabsorção óssea, tais como a osteoporose.

Verificou-se que os membros da classe dos inibidores de HMG-CoA redutase, conhecidos como as "estatinas", desencadeiam o crescimento de osso novo, substituindo a massa óssea perdida em resultado da osteoporose (ver The Wall Street Journal, Sexta-feira, 3 de Dezembro de 1999, página B1). Portanto as estatinas são

prometedoras para o tratamento da reabsorção óssea. Exemplos não limitativos de estatinas são lovastatina, simvastatina, atorvastatina e pravastatina.

Foram apresentadas provas do papel crucial de uroquinase-receptor de uroquinase (u-PA-u-PAR) na angiogénesse, invasão tumoral, inflamação e remodelagem da matriz durante a cicatrização e desenvolvimento de feridas [ver Y. Koshelnick *et al.*, "Mechanisms of signaling through Urokinase Receptor and the Cellular Response", *Thrombosis and Haemostasis* **82**:305-311 (1999) e F. Blasi, "Proteolysis, Cell Adhesion, Chemotaxis, and Invasiveness Are Regulated by the u-PA-u-PAR-PAI-I System", *Thrombosis and Haemostasis* **82**:298-304 (1999)]. Assim, verificou-se que antagonistas específicos da ligação de u-PA a u-PAR inibem a activação de plasminogénio à superfície das células, o crescimento neoplásico e a angiogénesse tanto em modelos *in vitro* como *in vivo*.

H. N. Lode e colaboradores em *PNAS USA* **96**:1591-1596 (1999) observaram efeitos sinérgicos entre um antagonista de integrina  $\alpha v$  anti-angiogénico e uma proteína de fusão anticorpo específico do tumor-citoquina (interleucina 2) na erradicação de metástases tumoriais espontâneas. Os seus resultados sugerem que esta combinação tem potencial no tratamento do cancro e no crescimento tumoral metastático.

Está descrito que a bomba ATPase de protões que

se encontra na membrana apical do osteoclasto desempenha um papel significativo no processo de reabsorção óssea. Assim, esta bomba de protões representa um alvo atraente para a concepção de inibidores de reabsorção óssea que são potencialmente úteis para o tratamento e prevenção da osteoporose e doenças metabólicas relacionada (ver C. Farina et al., "Selective inhibitors of the osteoclast vacuolar proton ATPase as novel bone antiresorptive agents", *DDT*, **4**: 163-172 (1999)).

Foram apresentadas provas de que os esteróides androgénicos desempenham um papel fisiológico no desenvolvimento da massa óssea em homens e mulheres e que os androgénios actuam directamente nos ossos. Demonstrou-se a presença de receptores de androgénios em linhas celulares semelhantes a osteoblastos humanos e demonstrou-se que os androgénios estimula directamente a proliferação e diferenciação das células ósseas. Para uma discussão, faz-se referência a S. R. Davis, "The therapeutic use of androgens in women", *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **69**:177-184 (1999) e K. A. Hansen e S. P. T. Tho, "Androgens and Bone Health", *Seminars in Reproductive Endocrinology*, **16**:129-134 (1998). Assim, os moduladores dos receptores de androgénios podem ter utilidade no tratamento e prevenção da massa óssea em mulheres.

Os activadores do receptor  $\gamma$  activado pelo proliferador peroxissomal (PPAR $\gamma$ ), tais como as tiazolidindionas (TZDs), inibem a formação de células semelhantes a

osteoclastos e a reabsorção óssea *in vitro*. Os resultados descritos por R. Okazaki *et al.* em *Endocrinology*, **140**:5060-5065 (1999) apontam para um mecanismo local em células de medula óssea bem como para um sistémico no metabolismo da glucose. Exemplos não limitativos de activadores de PPAR $\gamma$  incluem troglitazona, pioglitazona, rosiglitazona e BRL 49653.

A presente invenção também é dirigida a associações dos compostos da presente invenção com um ou mais agentes úteis na e prevenção ou tratamento da osteoporose. Por exemplo, os compostos da presente invenção podem ser efectivamente administrados em associação com quantidades eficazes de outros agentes tais como um bisfosfonato orgânico, um modulador dos receptores de estrogénios, um modulador dos receptores de androgénios, um secretagogo da hormona do crescimento, um inibidor de catepsina K, um inibidor de HMG-CoA redutase, um activador de PPAR $\gamma$  ou um inibidor da bomba ATPase de protões dos osteoclastos.

Ilustrações adicionais da invenção são métodos de tratamento de crescimento tumoral ou metástases num mamífero dele necessitado, compreendendo a administração ao mamífero de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto descrito acima e um ou mais agentes que se sabe serem citotóxicos/antiproliferativos. Além disso, os compostos da presente invenção podem ser administrados em combinação com radioterapia para tratamento do cancro crescimento tumoral metastático.

Além disso, os compostos antagonistas de integrina  $\alpha v \beta 3$  da presente invenção podem ser efectivamente administrados em associação com um secretagogo da hormona do crescimento num tratamento terapêutico ou profiláctico de perturbações do metabolismo do cálcio ou fosfato e doenças associadas. Estas doenças incluem patologias que podem beneficiar de uma redução da reabsorção óssea. Uma redução da reabsorção óssea deve melhorar o equilíbrio entre reabsorção e formação, reduzir a perda de massa óssea ou resultar em aumento da massa óssea. Uma redução da reabsorção óssea pode aliviar a dor associada a lesões osteolíticas e reduzir a incidência e/ou aumento destas lesões. Estas doenças incluem: osteoporose (incluindo a induzida por deficiência de estrogénios, imobilização, glucocorticóides e senil), osteodistrofia, doença de Paget, miosite ossificante, doença de Bechterew, hipercalcemia maligna, doença óssea metastática, doença periodônica, colelitíase, nefrolitíase, urolitíase, cálculos urinários, endurecimento das artérias (esclerose), artrite, bursite, neurite e tetania. A reabsorção óssea aumentada pode ser acompanhada por concentrações patologicamente elevadas de cálcio e fosfato no plasma, que seriam aliviadas por este tratamento. Analogamente, a presente invenção seroa útil no aumento de massa óssea em doentes com défice de hormona do crescimento. Assim, combinações preferidas são tratamentos simultâneos ou alternados com um antagonista do receptor de  $\alpha v \beta 3$  da presente invenção e um secretagogo da hormona do crescimento, incluindo opcionalmente um terceiro componente

compreendendo um bisfosfonato orgânico, preferencialmente tri-hidrato de alendronato monossódico.

De acordo com o método da presente invenção, os componentes individuais da combinação podem ser administrados separadamente em momentos diferentes durante o curso da terapêutica ou concorrentemente em formas divididas ou uma só combinação. A presente invenção é portanto para ser entendida como abrangendo todos esses regimes de tratamento simultâneos ou alternados, e o termo "administrar" é para ser interpretado em conformidade. Entender-se-á que o âmbito das combinações dos compostos desta invenção com outros agentes úteis para o tratamento de patologias mediadas por integrinas inclui em princípio qualquer combinação com qualquer composição farmacêutica útil para o tratamento da osteoporose.

Tal como aqui utilizado, o termo "composição" pretende abranger um produto compreendendo os componentes especificados nas quantidades especificadas, bem como qualquer produto que resulte, directa ou indirectamente, da combinação de componentes especificados nas quantidades especificadas.

Os compostos da presente invenção podem ser administrados em formas de dosagem orais tais como comprimidos, cápsulas (cada uma das quais inclui formulações de libertação prolongada ou temporizada), pílulas, pós,

grânulos, elixires, tinturas, suspensões, xaropes e emulsões. Analogamente, também podem ser administrados em forma intravenosa (bolus ou perfusão), intraperitoneal, tópica (e.g., gotas para os olhos), subcutânea, intramuscular ou transdérmica (e.g., penso), todas utilizando formas bem conhecidas pelas pessoas com conhecimentos correntes das artes farmacêuticas. Uma quantidade eficaz mas não tóxica do composto desejado pode ser utilizada como um antagonista de  $\alpha\beta 3$ .

O regime de dosagem utilizando os compostos da presente invenção é seleccionado de acordo com uma variedade de factores incluindo tipo, espécie, idade, peso, sexo e situação médica do doente; a gravidade da patologia a ser tratada; a via de administração; a função renal e hepática do doente; e o composto específico ou o seu sal a ser utilizado. Um médico, veterinário ou médico assistente com conhecimento correntes pode determinar prontamente e receitar a quantidade eficaz do fármaco necessário para impedir, contrariar ou fazer parar a evolução da patologia.

As dosagens orais da presente invenção, quando utilizadas para os efeitos indicados, variarão entre cerca de 0,01 mg por kg de peso corporal por dia (mg/kg/dia) até cerca de 100 mg/kg/dia, preferencialmente 0,01 a 10 mg/kg/dia, e mais preferencialmente ainda 0,1 a 5,0 mg/kg/dia. Para administração oral, as composições são preferencialmente proporcionadas na forma de comprimidos

contendo 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1,0, 2,5, 5,0, 10,0, 15,0, 25,0, 50,0, 100 e 500 miligramas da substância activa para ajustamento sintomático da dosagem do doente a ser tratado.

Um medicamento tipicamente contém desde cerca de 0,01 mg até cerca de 500 mg da substância activa, preferencialmente desde cerca de 1 mg até cerca de 100 mg da substância activa. Intravenosamente, as doses mais preferidas variarão desde cerca de 0,1 a cerca de 10 mg/kg/minuto durante uma perfusão a velocidade constante. Com vantagem, os compostos da presente invenção podem ser administrados numa dose diária única, ou a dose diária total pode ser administradas em doses divididas duas, três ou quatro vezes por dia. Além disso, os compostos preferidos para a presente invenção podem ser administrados em forma intranasal através de utilização tópica de veículos intranasais adequados, ou por via transdérmica, utilizando as formas de pensos transdérmicos bem conhecidas pelas pessoas com conhecimentos correntes da matéria. Para administração na forma de um sistema de administração transdérmica, a administração da dosagem será, é claro, contínua em vez de intermitente ao longo do regime de dosagem.

Nos métodos da presente invenção, os compostos aqui descritos em pormenor podem formar a substância activa, e são tipicamente administrados em mistura íntima com diluentes, excipientes ou veículos farmacêuticos adequados (aqui referidos colectivamente como materiais "veículos") adequadamente seleccionados tendo em conta a

forma de administração pretendida, isto é, comprimidos, cápsulas, elixires, xaropes orais e outras semelhantes, e consistentes com a prática farmacêutica corrente.

Por exemplo, para administração oral na forma de um comprimido ou cápsula, o componente farmacologicamente activo pode ser combinado com um veículo oral, não tóxico, inerte, farmaceuticamente aceitável tal como lactose, amido, sacarose, glucose, metil celulose, estearato de magnésio, fosfato dicálcico, sulfato de cálcio, manitol, sorbitol e outros semelhantes; para administração oral em forma líquida, os componentes farmacológicos orais podem ser combinados com qualquer veículo oral, não tóxico, farmaceuticamente aceitável, inerte tal como etanol, glicerol, água e outros semelhantes. Além disso, quando desejado ou necessário, também podem ser incorporados na mistura aglutinantes, lubrificantes, agentes desintegrantes e agentes corantes. Os aglutinantes adequados incluem amido, gelatina, açúcares naturais tais como glucose ou beta-lactose, edulcorantes do milho, gomas naturais e sintéticas tais como acácia, tragacanta ou alginato de sódio, carboximetilcelulose, polietileno glicol, ceras e outros semelhantes. Os lubrificantes utilizados nestas formas de dosagem incluem oleato de sódio, estearato de sódio, estearato de magnésio, benzoato de sódio, acetato de sódio, cloreto de sódio e outros semelhantes. Os desintegrantes incluem, sem limitação, amido, metil celulose, agar, bentonite, goma xantana e outros semelhantes.

Os compostos da presente invenção também podem ser administrados na forma de sistemas de administração lipossomal, tais como vesículas unilamelares pequenas, vesículas unilamelares grandes e vesículas multilamelares. Os lipossomas podem ser formados a partir de uma variedade de fosfolípidos, tais como colesterol, estearilamina ou fosfatidilcolinas.

Os compostos da presente invenção também podem ser administrados pela utilização de anticorpos monoclonais como veículos individuais aos quais são acopladas as moléculas do composto. Os compostos da presente invenção também podem ser acoplados com polímeros solúveis como veículos de fármacos direcccionáveis. Esses polímeros podem incluir polivinilpirrolidona, copolímero de pirano, polihidroxi-propilmetacrilamida-fenol, poli-hidroxi-etilaspartamida-fenol, ou poli(óxido de etileno)-polilisina substituído com resíduos palmitoílo. Além disso, os compostos da presente invenção podem ser acoplados a uma classe de polímeros biodegradáveis úteis para conseguir a libertação controlada de um fármaco, por exemplo, poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), copolímeros de poli(ácido láctico) e poli(ácido glicólico), poli- $\epsilon$ -caprolactona, poli(ácido hidroxi butírico), poliortoésteres, poliacetais, polidihidropiranos, policianoacrilatos e copolímeros de blocos reticulados ou anfipáticos de hidrogeles.

Nos Esquemas e Exemplos adiante, vários símbolos e abreviaturas de reagentes têm os significados seguintes:

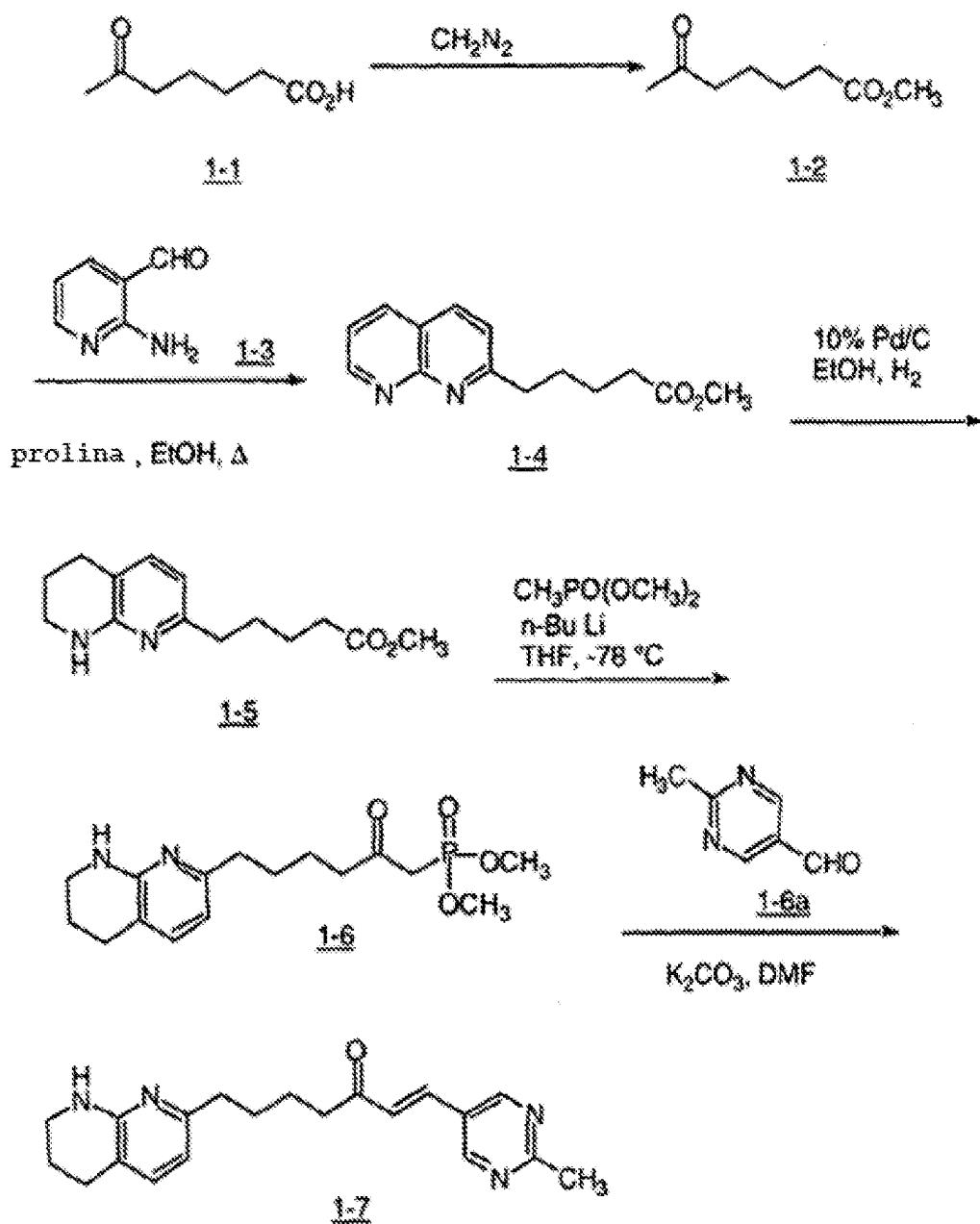
AcOH:	Ácido acético
BH <sub>3</sub> .DMS:	Borano.sulfureto de dimetilo
BOC (Boc) :	t-Butiloxicarbonilo
BOP:	Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-iloxitris-(dimetilamino)-fosfónio
CBZ (Cbz) :	Carbobenziloxi ou benziloxicarbonilo
CDI:	Carbonildiimidazole
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :	Cloreto de metíleno
CH <sub>3</sub> CN:	Acetonitrilo
CHCl <sub>3</sub> :	Clorofórmio
DEAD:	Azodicarboxilato de dietilo
DIAD:	Azodicarboxilato de diisopropilo
DIBAH ou DIBAL-H:	Hidreto de diisobutilalumínio
DIPEA:	Diisopropiletilamina
DMAP:	4-Dimetilaminopiridina
DME:	1,2-Dimetoxietano
DMF:	N,N-Dimetilformamida
DMSO:	Sulfóxido de dimetilo
DPFN:	Nitrato de 3,5-dimetil-1-pirazolil-formamidina
EDC:	1-(3-Dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida.HCl
EtOAc:	Acetato de etilo
EtOH:	Etanol
HOAc:	Ácido acético
HOAT:	1-Hidroxi-7-azabenzotriazole
HOBT:	1-Hidroxibenzotriazole

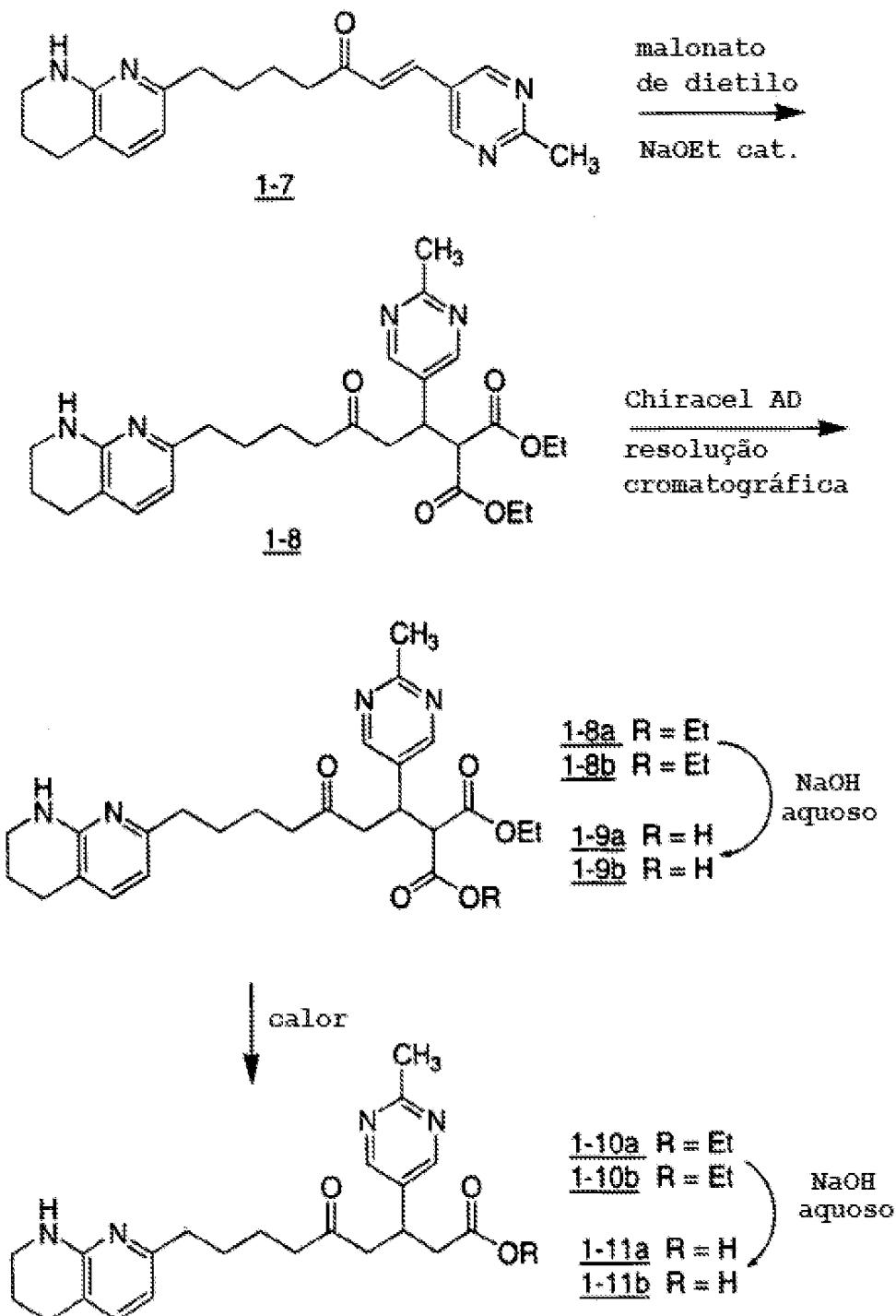
HPLC:	Cromatografia líquida de alto desempenho
IBCF:	Cloroformato de isobutilo
LDA:	Diisopropilamida de lítio
MeOH:	Metanol
MNNG:	1,1-Metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina
NET3:	Trietilamina
NMM:	N-Metilmorfolina
PCA.HCl:	Cloridrato de pirazole carboxamidina
Pd/C:	Catalisador de paládio sobre carvão activado
Ph:	Fenilo
pTSA:	Ácido p-toluenossulfónico
TEA:	Trietilamina
TFA:	Ácido trifluoroacético
THF:	Tetra-hidrofurano
TLC:	Cromatografia em camada fina
TMEDA:	N,N,N',N'-Tetrametiletlenodiamina
TMS:	Trimetilsililo

Os novos compostos da presente invenção podem ser preparados de acordo com os procedimentos dos seguintes Esquemas Reaccionais e Exemplos, ou modificações suas, utilizando materiais de partida e reagentes prontamente disponíveis e, quando apropriado, procedimentos sintéticos convencionais. Nestes procedimentos, também é possível utilizar variantes que são elas próprias conhecidas pelas pessoas com conhecimentos correntes das artes da química orgânica sintética, mas que não estão mencionadas em maior

detalhe. Por exemplo, a substituição de 5-formil-2-metilpirimidina (1-6a) no Esquema 1 pelo aril-CHO apropriadamente substituído dá o composto correspondente em que o grupo arilo R<sup>7</sup> é diferente de 2-metil-pirimidin-5-ilo. A resolução da mistura racémica dos (R) e (S) ceto diésteres 1-8 pode ser realizada por cromatografia HPLC num suporte sólido quiral, tal como colunas Chiralcel AD ou Chiralcel OD. Deste modo são isolados os enantiómeros (E) e (S) individuais, tais como 1-8a e 1-8b, substancialmente isentos do outro enantiómero. Os produtos finais resolvidos 3(R) e 3(S), tais como 1-11a e 1-11b, são derivados dos precursores ceto diéster numa sequência com três passos de hidrólise, descarboxilação e hidrólise.

Os Exemplos seguintes são ilustrativos dos compostos mais preferidos da presente invenção. Não, contudo, para ser considerados como formando o único género que é considerado como a invenção. Os Exemplos ilustram ainda pormenores para a preparação dos compostos da presente invenção. Os especialistas na matéria entenderão prontamente que podem ser utilizadas variantes conhecidas das condições e processos dos procedimentos preparativos seguintes para prepara estes compostos. Salvo indicação em contrário, todas as operações foram realizadas à temperatura ambiente e todas as temperaturas são em graus Celsius.

ESQUEMA 1

ESQUEMA 1 (Cont.)

EXEMPLO 1 (de referência)

Ácido 3(S ou R)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-nonanóico (1-11a)

Passo A: Éster metílico do ácido 6-oxo-heptanóico (1-2)

A uma mistura com agitação rápida de éter dietílico (175 mL) e KOH a 40% (52 mL) a 0°C adicionou-se MNNG (15,4 g, 105 mmol). A mistura foi agitada durante 10 minutos. A camada etérea foi transferida para uma solução de ácido 6-oxo-heptanóico 1-1 (5,0 g, 34,68 mmol) e CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 0°C. A solução foi purgada com argônio durante 30 minutos e depois concentrada. A cromatografia rápida (sílica, 30% a 50% de EtOAc/hexanos) deu o éster 1-2 como um óleo transparente.

TLC R<sub>f</sub> = 0,88 (sílica, EtOAc).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3,67 (s, 3H), 2,46 (m, 2H), 2,33 (m, 2H), 2,14 (s, 3H), 1,62 (m, 4H).

Passo B: Éster metílico do ácido 5-[1,8]-naftiridin-2-il-pentanóico (1-4)

Uma mistura de 1-2 (1,4 g, 9,04 mmol), 1-3, 2-amino-3-formilpiridina (552 mg, 4,52 mmol) (para a preparação, ver: *J. Org. Chem.*, 1983, **48**, 3401) e prolina (260 mg, 2,26 mmol) em etanol absoluto (23 mL) foi aquecida a refluxo durante 18 h. Após a remoção do solvente por

evaporação, o resíduo foi cromatografado (gel de sílica, 80% de acetato de etilo/hexano, depois acetato de etilo) para dar o éster 1-4 como um sólido branco.

TLC  $R_f = 0,38$  (sílica, EtOAc).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  9,08 (m, 1H), 8,16 (d,  $J=8,0$  Hz, 1H), 8,10 (d,  $J=8,3$  Hz, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,39 (d,  $J=8,3$  Hz, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,08 (t,  $J=7,6$  Hz, 2H), 2,39 (t,  $J=7,6$  Hz, 2H), 1,94 (m, 2H), 1,78 (m, 2H).

Passo C: Éster metílico do ácido 5-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-pentanóico (1-5)

Uma mistura de 1-4 (630 mg, 2,58 mmol) e Pd a 10% sobre carvão (95 mg) em EtOH (25 mL) foi agitada sob um balão de hidrogénio durante 72 h. Após filtração e remoção do solvente por evaporação, o resíduo foi cromatografado (gel de sílica, 70% de acetato de etilo/hexanos) para dar 1-5 como um óleo incolor.

TLC  $R_f = 0,58$  (sílica, acetato de etilo).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,05 (d,  $J=7,3$  Hz, 1H), 6,34 (d,  $J=7,3$  Hz, 1H), 4,72 (s, 1H), 3,66 (s, 3H), 3,40 (m, 2H), 2,69 (t,  $J=6,3$  Hz, 2H), 2,53 (m, 2H), 2,33 (m, 2H), 1,90 (m, 2H), 1,66 (m, 4H).

Passo D: Éster dimetílico do ácido 2-oxo-6-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]-naftiridin-2-il)-hexil-fosfónico (1-6)

Uma solução de metilfosfonato de dimetilo (13,20

g, 106,5 mmol) em THF anidro (165 mL) foi arrefecida a -78° e tratada gota a gota com n-BuLi 2,5 M (42,3 mL). Após agitação a -78° durante 45 min, adicionou-se uma solução de éster 1-5 (6,6 g, 26,6 mmol) em THF (35 mL) gota a gota e a solução resultante foi agitada durante 30 min a -78°, desactivada com NH<sub>4</sub>Cl saturado (100 mL) e depois extraída com acetato de etilo (3 x 150 mL). Os extractos orgânicos combinados foram secos (MgSO<sub>4</sub>), filtrados e concentrados para dar um óleo amarelo. A cromatografia em gel de sílica (5% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) deu 1-6 como um óleo amarelo.

R<sub>f</sub> (sílica, 5% de MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) = 0,20.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,05 (d, J=7,3 Hz, 1H), 6,34 (d, J=7,32 Hz, 1H), 4,80 (br, s, 1H), 3,81 (s, 3H), 3,75 (s, 3H), 3,4 (m, 2H), 3,08 (d, J=22,7 Hz), 2,7-2,5 (m, 6H), 1,91 (m, 2H), 1,68 (m, 4H).

Passo E: 1-(2-Metil-pirimidin-5-il)-7-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-hept-1-en-3-ona (1-7)

A uma solução de 1-6 (5,5 g, 16,2 mmol), 5-formil-2-metilpirimidina (1-6a, 1,8 g, 14,7 mmol; para a preparação, ver *J. Heterocyclic Chem.*, **28**, 1281 (1991)) em 40 mL de DMF adicionou-se K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (4,07 g, 32 mmol). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 15 h e concentrada até uma pasta. O resíduo foi diluído com água, extraído com acetato de etilo, e seco sobre sulfato de magnésio. Após concentração, o resíduo foi cromatografado

em gel de sílica (70 de clorofórmio/25 de acetato de etilo/5 de metanol) para dar 1-7 como um sólido branco.

$R_f$  = 0,20 (sílica, 70 de clorofórmio/20 de acetato de etilo/10 de metanol).

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,80 (s, 2H), 7,44 (d, 1H,  $J=16$  Hz), 7,05 (d, 1H,  $J=7$  Hz), 6,81 (d, 1H,  $J=16$  Hz), 6,35 (d, 1H,  $J=7$  Hz), 4,72 (br s, 1H), 3,39 (m, 2H), 2,69 (s, 3H), 2,64 (m, 4H), 2,58 (m, 2H), 1,91 (m, 2H), 1,74 (m, 4H).

Passo F: Ester dietílico do ácido 2-[1(S ou R)-(2-metilpirimidin-5-il)-3-oxo-7-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-heptil]-malónico (1-8a)

A uma solução de 1-7 (1,0 g, 2,97 mmol) e malonato de dietilo (0,717 mL, 4,5 mmol) em etanol (20 mL) e THF (20 mL) adicionou-se etóxido de sódio (0,1 mL de uma solução a 30% p/p em etanol). Após 4 h, a mistura (1-8) foi concentrada e o resíduo purificado numa coluna Chiralcel AD de 5 x 50 cm (caudal = 80 mL/min, A:B = 30:70) (A = 0,1% de dietilamina/hexano, B = 2-propanol). O produto 1-8a eluiu aos 15 minutos; o seu enantiómero, 1-8b, eluiu aos 26 minutos.

$^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,53 (s, 2H), 7,02 (d, 1H,  $J=7$  Hz), 6,28 (d, 1H,  $J=7$  Hz), 4,07 (br s, 1H), 4,18 (m, 2H), 4,02 (m, 2H), 3,92 (m, 1H), 3,72 (m, 2H), 3,39 (m, 2H), 2,94 (m, 2H), 2,64 (s, 3H), 2,42 (m, 2H), 2,33 (m, 2H), 1,89 (m, 2H), 1,60 (m, 4H), 1,26 (m, 4H), 1,19 (t, 3H,  $J=3$  Hz).

Passo G: Éster etílico do ácido 3(S ou R)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-nonanóico (1-10a)

A uma solução de 1-8a (0,530 g, 1,07 mmol) em etanol (5 mL) adicionou-se NaOH (1,12 mL de uma solução 1 N em água, 1,12 mmol). Após agitação a 40°C durante 30 minutos, a mistura foi tratada com HCl (1,12 mL de uma solução 1 N em água, 1,12 mmol) e concentrada. O resíduo foi suspenso em tolueno (20 mL) e aquecido a refluxo. Após 1 h, a evaporação dos solventes deu 1-10a como um óleo amarelo.

$R_f$  = 0,32 (sílica, 70 de clorofórmio/20 de acetato de etilo/10 de metanol).

$^1H$  NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,54 (s, 2H), 7,04 (d, 1H, J=7 Hz), 6,31 (d, 1H, J=7 Hz), 4,86 (br s, 1H), 4,04 (q, 2H, J=3 Hz), 3,63 (m, 1H), 3,40 (m, 2H), 2,94-2,48 (m, 9H), 2,37 (m, 4H), 1,89 (m, 2H), 1,57 (m, 4H), 1,19 (t, 3H, J=3 Hz).

Passo H: Ácido 3(S ou R)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-nonanóico (1-11a)

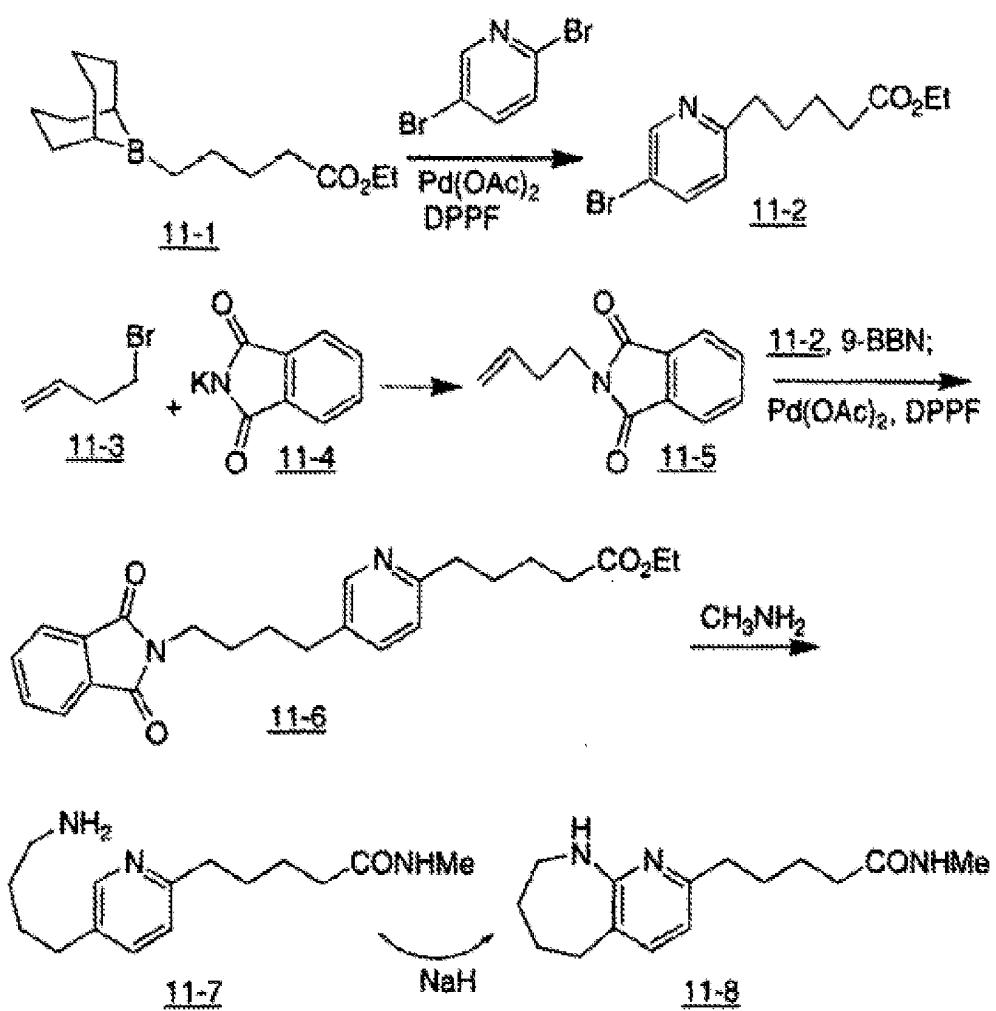
A uma solução de 1-10a (0,15 g, 0,353 mmol) em etanol (1 mL) adicionou-se NaOH (0,39 mL de uma solução 1 N em água, 0,39 mmol). Após 30 minutos, a mistura foi concentrada e o resíduo cromatografado em gel de sílica (20:10:1:1 até 10:10:1:1 de acetato de etilo/eta-

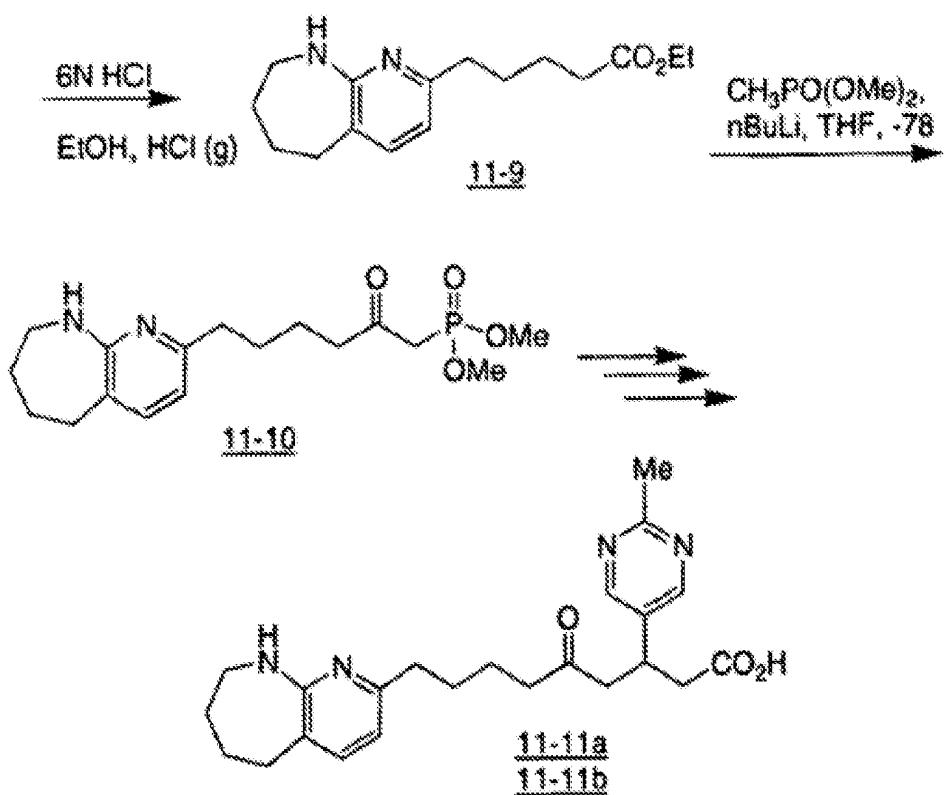
nol/NH<sub>4</sub>OH/água) para dar 11-1a como um sólido branco.

R<sub>f</sub> = 0,21 (sílica, 10:10:1:1 de acetato de etilo/etanol/NH<sub>4</sub>OH/ água).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,62 (s, 2H), 7,43 (d, 1H, J=7 Hz), 3,68 (m, 1H), 3,43 (m, 2H), 3,02 (m, 2H), 2,80 (m, 3H), 2,59 (m, 10H), 1,91 (m, 2H), 1,60 (m, 3H).

### Esquema 11





#### EXEMPLO 16

Ácido 3(R) e 3(S)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico (11-11a e 11-11b)

Passo A: Éster etílico do ácido 5-(5-bromo-piridin-2-il)-pentanóico (11-2)

A uma solução com agitação de ácido etil-1-pentenóico (10 g, 78 mmol) em TBF desgasificado (80 mL) a 0°C adicionou-se gota a gota uma solução de 9-BBN (187 mL de 0,5 M em TBF, 94 mmol) e a mistura foi agitada durante

18 horas à temperatura ambiente para dar 11-1. Adicionou-se  $K_2CO_3$  (18,4 g, 133 mmol) e 2,5-dibromopiridina (18,5 g, 78 mmol), seguidos por uma suspensão pré-misturada e envelhecida ( $70^{\circ}C$  durante 30 min) de  $Pd(OAc)_2$  (2,0 g, 8,9 mmol) e DPPF (5,4 g, 9,8 mmol) em DMF desgaseificada (80 mL). A mistura resultante foi agitada durante 18 horas a  $70^{\circ}C$ , arrefecida, diluída com acetato de etilo, lavada com água e solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca sobre  $MgSO_4$  e concentrada. Ao resíduo com agitação dissolvido em TBF (400 mL) adicionou-se água (150 mL) e  $NaHCO_3$  (33 g) e após 10 minutos,  $NaBO_3 \cdot H_2O$  (48 g). Após agitação vigorosa durante 30 minutos, a mistura foi diluída com acetato de etilo, lavada com água e solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca sobre  $MgSO_4$ , e concentrada até um óleo. O resíduo foi cromatografado em gel de sílica (10-20% de EtOAc/hexano) para dar 11-2 como um óleo incolor.

TLC  $R_f = 0,75$  (sílica, 40% de EtOAc/hexano).

$^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ ):  $\delta$  8,57 (s, 1H), 7,70 (m, 1H), 7,05 (d, 1H,  $J=8$  Hz), 4,15 (q, 2H,  $J=6$  Hz), 2,77 (t, 2H,  $J=7$  Hz), 2,34 (t, 2H,  $J=7$  Hz), 1,7 (m, 4H), 1,26 (t, 3H,  $J=6$  Hz).

Passo B: 2-But-3-enil-isoindole-1,3-diona (11-5)

A uma solução com agitação de 4-bromo-1-buteno (11-3, 20 g, 148 mmol) em DMF (150 mL) adicionou-se

ftalimida de potássio (11-4, 25 g, 133 mmol) e a mistura foi agitada durante 18 horas a 70°C. Após arrefecimento até à TA, a mistura foi diluída com éter, lavada com água e solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrada para dar 11-5 como um sólido branco.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,85 (m, 2H), 7,72 (m, 2H), 5,82 (m, 1H), 5,08 (m, 2H), 3,77 (t, 2H, J=7 Hz), 2,44 (m, 2H).

Passo C: Éster etílico do ácido 5-{5-[4-(1,3-dioxo-1,3-dihidro-isoindol-2-il)-butil]-piridin-2-il}-pentanóico (11-6)

A uma solução com agitação de 11-5 (4,23 g, 21 mmol) em THF desgaseificado (20 mL) a 0°C adicionou-se gota a gota uma solução de 9-BBN (50,4 mL de 0,5 M em THF, 25,2 mmol) e a mistura foi agitada durante 18 horas à temperatura ambiente. Adicionou-se K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,0 g, 35,8 mmol) e 11-2 (5,0 g, 17,4 mmol), seguidos por uma suspensão pré-misturada e envelhecida (70°C durante 30 min) de Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,54 g, 2,4 mmol) e DPPF (1,45 g, 2,6 mmol) em DMF desgaseificada (20 mL). A mistura resultante foi agitada durante 18 horas a 70°C, arrefecida, diluída com acetato de etilo, lavada com água e solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrada. Ao resíduo com agitação dissolvido em THF (200 mL) adicionou-se água (75 mL) e NaHCO<sub>3</sub> (16,5 g) e após 10 minutos, NaBO<sub>3</sub>.H<sub>2</sub>O (24 g). Após agitação vigorosa durante 30 minutos, a mistura foi diluída com acetato de etilo, lavada com água e solução

aquosa saturada de cloreto de sódio, seca sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrada até um óleo. O resíduo foi cromatografado em gel de sílica (20-40% de EtOAc/hexano) para dar 11-6 como um sólido amarelo.

TLC R<sub>f</sub> = 0,31 (sílica, 50% de EtOAc/hexano).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,37 (s, 1H), 7,84 (m, 2H), 7,75 (m, 2H), 7,40 (m, 1H), 7,05 (m, 1H), 4,12 (q, 2H, J=7 Hz), 3,71 (m, 2H), 2,78 (t, 2H, J=7 Hz), 2,62 (t, 2H, J=7 Hz), 2,33 (t, 2H, J=7 Hz), 1,64 (m, 8H), 1,23 (t, 3H, J=6 Hz).

Passo D: Metilamida do ácido 5-[5-(4-amino-butil)-piridin-2-il]-pentanóico (11-7)

Uma mistura de 11-6 (45 g, 110 mmol) e uma solução saturada de metilamina em metanol (300 mL) num tubo selado foi aquecida a 70°C durante 12 horas. A mistura foi arrefecida e concentrada até um óleo. O resíduo foi cromatografado em gel de sílica (10:10:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O) para dar 11-7 como um óleo amarelo.

TLC R<sub>f</sub> = 0,16 (sílica, 10:10:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,32 (s, 1H), 7,41 (m, 1H), 7,07 (m, 1H), 2,74 (m, 7H), 2,59 (t, 2H, J=6 Hz), 2,21 (t, 2H, J=6 Hz), 1,69 (m, 6H), 1,48 (m, 2H).

Passo E: Metilamida do ácido 5-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-pentanóico (11-8)

Uma mistura de 11-7 (24 g, 91,2 mmol) e NaH (10,9

g de uma dispersão a 60% em peso em óleo mineral, 273 mmol) em xilenos (500 mL) foi purgada com árgon durante 30 min, e depois aquecida a refluxo durante 72 horas. A mistura foi arrefecida, desactivada com etanol, diluída com carbonato de potássio aquoso a 10% e extraída com acetato de etilo. Os extractos orgânicos foram secos sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrados até um óleo. O resíduo foi cromatografado em gel de sílica (70:25:5 de CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH/H<sub>2</sub>O) para dar 11-8 como um sólido branco.

TLC R<sub>f</sub> = 0,15 (sílica, 70:25:5 de CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,24 (d, 1H, J=7 Hz), 6,53 (d, 1H, J=7 Hz), 5,43 (br s, 1H), 4,62 (br s, 1H), 3,12 (m, 2H), 2,79 (d, 3H, J=5 Hz), 2,63 (m, 4H), 2,18 (m, 2H), 1,81 (m, 2H), 1,68 (m, 6 Hz).

Passo F: Éster etílico do ácido 5-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-pentanóico (11-9)

Uma mistura de 11-8 (3 g, 11,5 mmol) e HCl 6 M (100 mL) num tubo selado foi aquecida a 70°C durante 12 horas. A mistura foi arrefecida e concentrada até um óleo. O resíduo foi azeotropado duas vezes de etanol (50 mL), depois dissolvido em HCl 4 M em etanol (100 mL) e aquecido a 70°C durante 1 hora. A mistura foi arrefecida e concentrada até um óleo. O resíduo foi diluído com acetato de etilo, lavado com carbonato de potássio aquoso a 10% e

solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seco sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrados para dar 11-9 como um óleo castanho.

TLC R<sub>f</sub> = 0,44 (sílica, 70:25:5 de CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH).

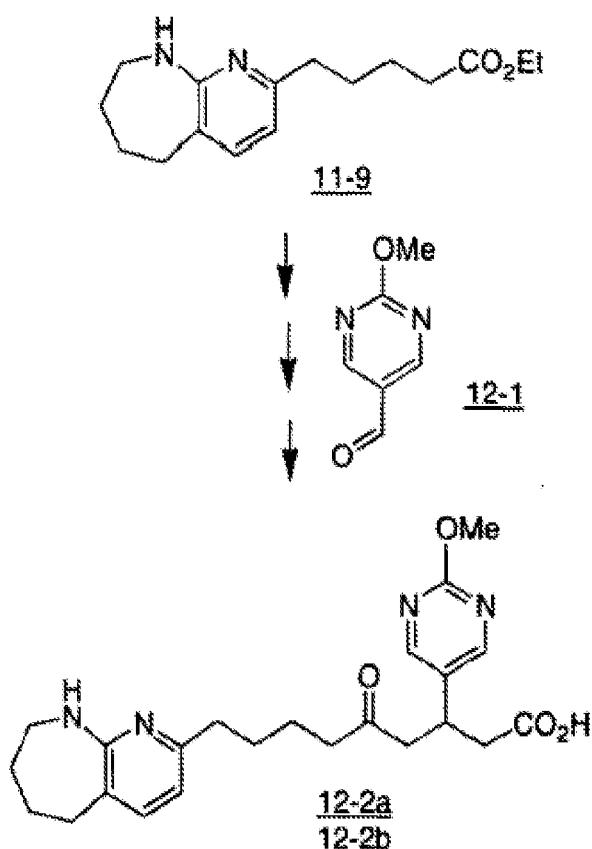
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7,22 (d, 1H, J=7 Hz), 6,53 (d, 1H, J=7 Hz), 4,63 (br s, 1H), 4,11 (q, 2H, J=7 Hz), 3,12 (m, 2H), 2,66 (m, 2H), 2,62 (t, 2H, J=6 Hz), 2,33 (t, 2H, J=6 Hz), 1,70 (m, 2H), 1,63 (m, 6H), 1,27 (t, 3H, J=7 Hz).

Passo G: Ácido 3(R) e 3(S)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico (11-11a e 1-11b)

Utilizando os procedimentos para a conversão de 1-5 em 1-11a e 1-11b, 11-9 foi convertido em 1-11a e 11-11b por meio de 11-10. A resolução dos enantiómeros foi realizada por cromatografia quiral do intermediário ceto diéster correspondente a 1-8 numa coluna Chiralcel AD (10 cm x 50 cm) utilizando 70% de A/30% de B (A = 2-propanol; B = 0,1% de dietilamina em hexanos) a um caudal de 250 mL/min.

TLC R<sub>f</sub> = 0,21 (sílica, 10:10:1:1 EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 8,63 (s, 2H), 7,42 (d, 1H, J=7 Hz), 6,55 (d, 1H, J=7 Hz), 3,64 (m, 1H), 3,31 (m, 2H), 3,05 (m, 1H), 2,87 (m, 1H), 2,77 (m, 2H), 2,58 (m, 9H), 1,84 (m, 4H), 1,57 (m, 4H).

Esquema 12EXEMPLO 17

Ácido 3(R) e 3(S)-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico (12-2a e 12-2b)

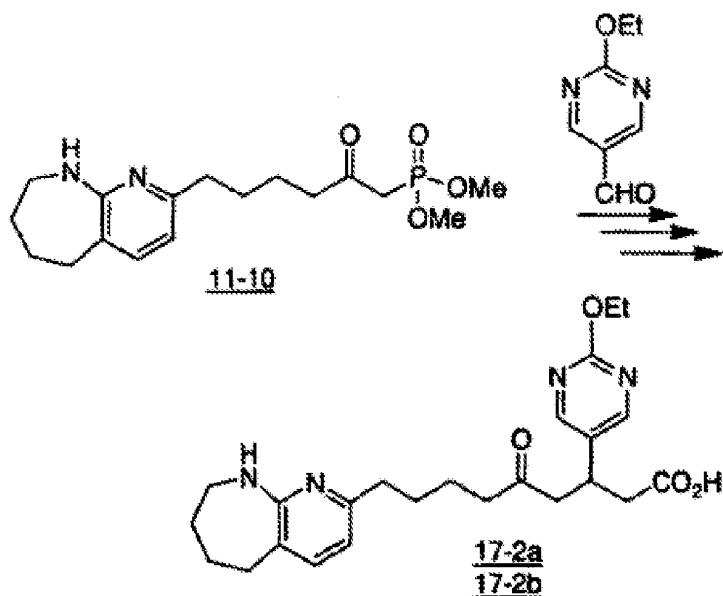
Utilizando os procedimentos para a conversão de 1-5 em 1-11a e 1-11b, 11-9 e 2-metoxi-pirimidino-5-carbaldeído (12-1, para a preparação, ver *J. Heterocycl. Chem.* (1991), **28**, 1281) foram convertidos em 12-2a e 12-2b. A resolução dos enantiómeros foi realizada por croma-

tografia quiral do intermediário ceto diéster corresponde a 1-8 numa coluna Chiralcel AD (10 cm x 50 cm) utilizando 70% de A/30% de B (A = 2-propanol; B = 0,1% de dietilamina em hexanos) a um caudal de 250 mL/min.

TLC  $R_f$  = 0,21 (sílica, 10:10:1:1 EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OEt/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  8,48 (s, 2H), 7,42 (d, 1H, J=7 Hz), 6,56 (d, 1H, J=7 Hz), 3,94 (s, 3H), 3,62 (m, 1H), 3,29 (m, 2H), 2,98 (m, 1H), 2,85 (m, 1H), 2,79 (m, 2H), 2,58 (m, 2H), 1,84 (m, 4H), 1,57 (m, 4H).

### Esquema 17



### EXEMPLO 23

Ácido 3(R) e 3(S)-(2-ethoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico (17-2a e 17-2b)

Utilizando os procedimentos para a conversão de

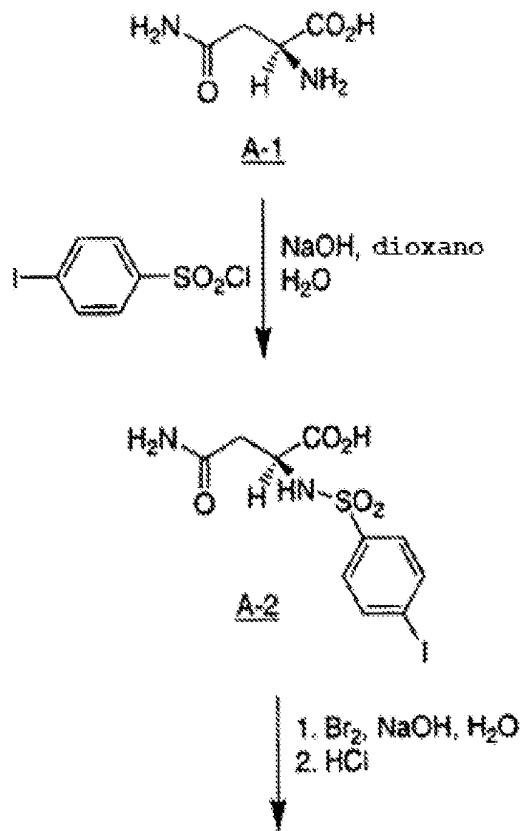
1-6 em 1-11a e 1-11b, 11-10 e 2-etoxi-pirimidino-5-carbaldeído foram convertidos em 17-2a e 17-2b. A resolução dos enantiómeros foi realizada por cromatografia quiral do intermediário ceto diéster correspondente a 1-8.

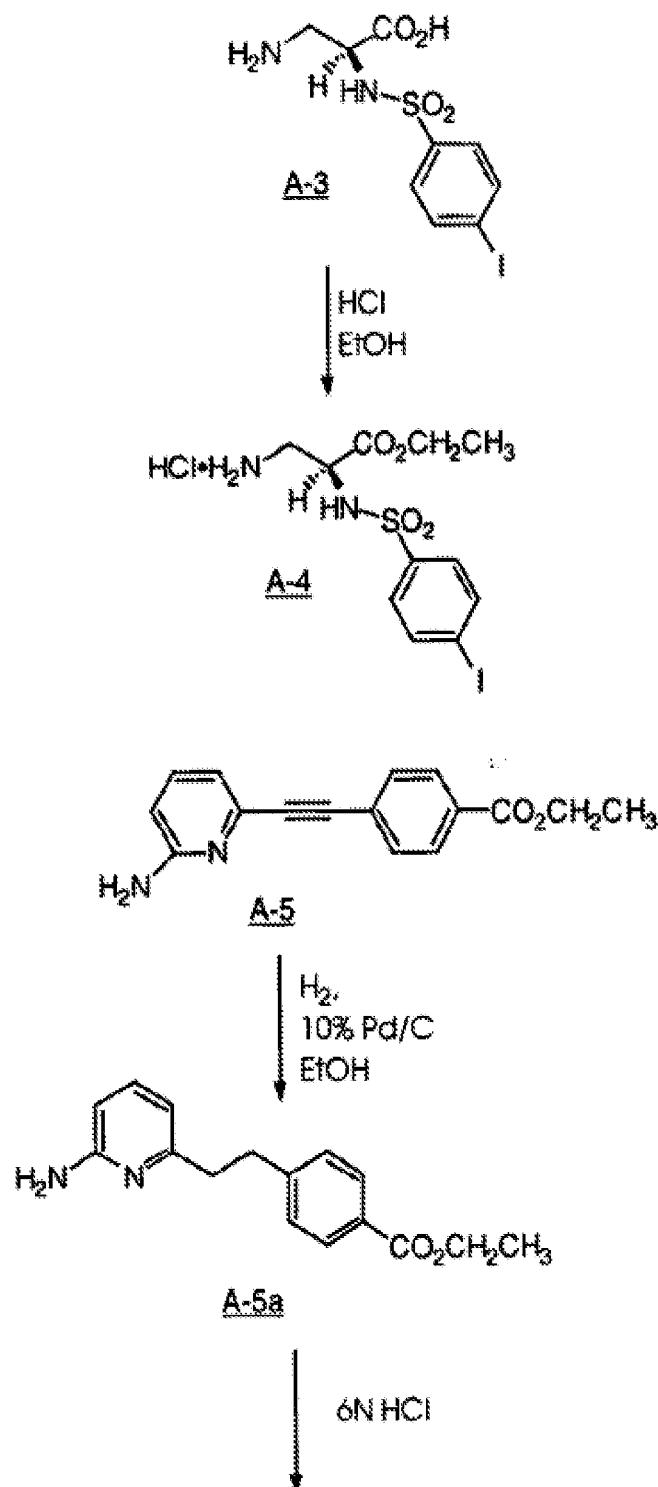
TLC  $R_f = 0,24$  (sílica, 10:10:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O).

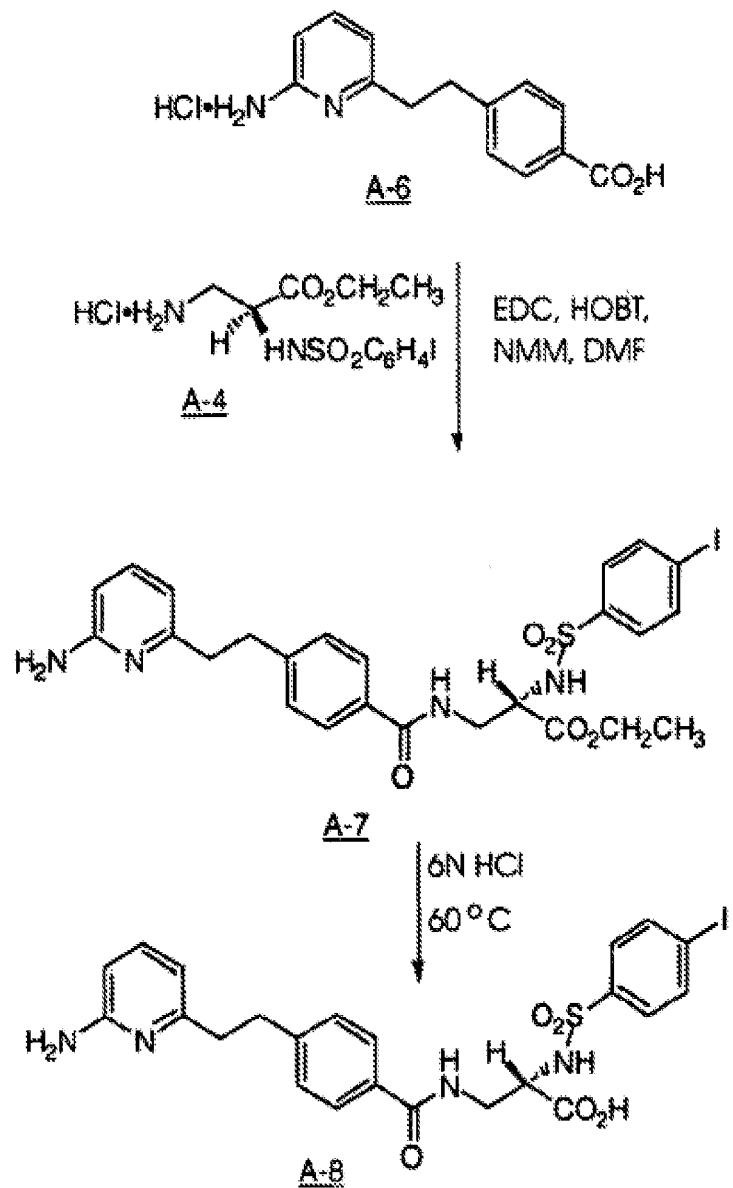
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 8,48 (s, 2H), 7,43 (d, 1H, J=7 Hz), 6,55 (d, 1H, J=7 Hz), 4,38 (q 2H, J=7 Hz), 3,63 (m, 1H), 2,98 (m, 1H), 2,79 (m, 3H), 2,55 (m, 6H), 1,84 (m, 4H), 1,57 (m, 4H), 1,38 (t, 3H, J=7 Hz).

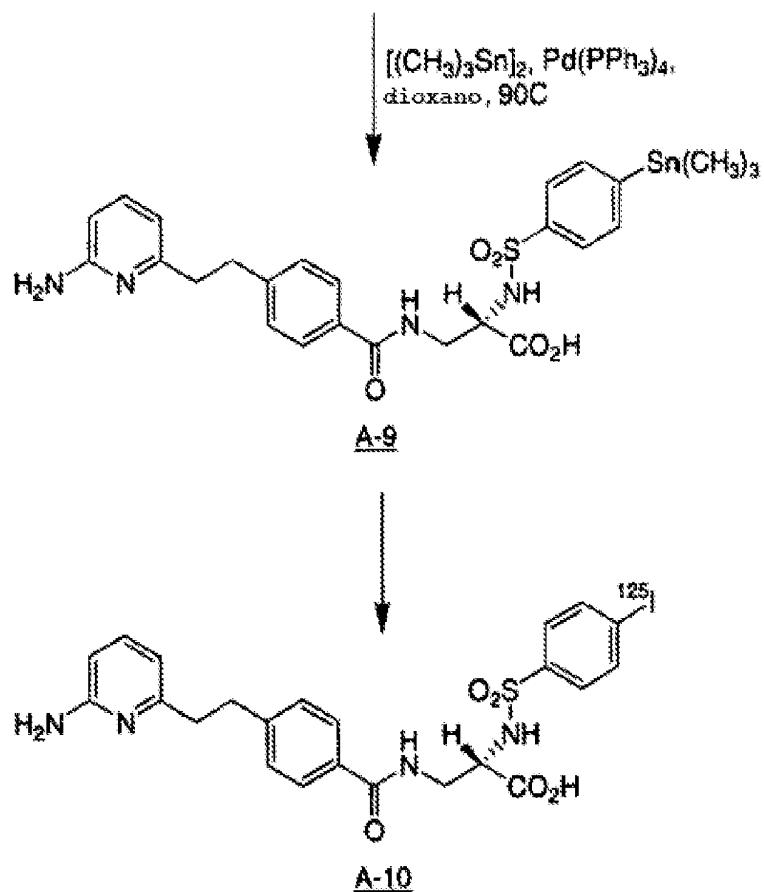
#### ESQUEMA A

#### Síntese do Radioligando para o Ensaio SPAV3



ESQUEMA A (cont.)

ESQUEMA A (cont.)



N-(4-Iodo-fenilsulfonilamino)-L-asparagina (A-2)

A uma solução com agitação de ácido A-1 (4,39 g, 33,2 mmol), NaOH (1,49 g, 37,2 mmol), dioxano (30 mL) e H<sub>2</sub>O (30 mL) a 0°C adicionou-se cloreto de pipsilo (10,34 g, 34,2 mmol). Após 5 minutos, adicionou-se NaOH (1,49, 37,2 mmol) dissolvido em 15 mL de H<sub>2</sub>O, seguido por remoção do banho de arrefecimento. Após 2,0 h, a mistura reaccional foi concentrada. O resíduo foi dissolvido em H<sub>2</sub>O (300 mL) e depois lavado com EtOAc. A porção aquosa foi arrefecida a 0°C e depois acidificada com HCl concentrado. O sólido foi

recolhido e depois lavado com Et<sub>2</sub>O para dar o ácido A-2 como um sólido branco.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 7,86 (d, 2H, J=8 Hz), 7,48 (d, 2H, J=8 Hz) 3,70 (m, 1H), 2,39 (m, 2H).

2(S)-(4-Iodo-fenilsulfonilamino)-β-alanina (A-3)

A uma solução com agitação de NaOH (7,14 g, 181,8 mmol) e H<sub>2</sub>O (40 mL) a 0°C adicionou-se Br<sub>2</sub> (1,30 mL, 24,9 mmol) gota a gota ao longo de um período de dez minutos. Após 5 minutos, o ácido A-2 (9,9 g, 24,9 mmol), NaOH (2,00 g, 49,8 mmol) e H<sub>2</sub>O (35 mL) foram combinados, arrefecidos a 0°C e depois adicionados numa só porção à reacção. Após agitação durante 20 minutos a 0°C, a reacção foi aquecida a 90°C durante 30 minutos e depois de novo arrefecida a 0°C. O pH foi ajustado a 7 por adição gota a gota de HCl concentrado. O sólido foi recolhido, lavado com EtOAc e depois seco em vácuo para dar ácido A-3 como um sólido branco.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, D<sub>2</sub>O) δ 8,02 (d, 2H, J=8 Hz), 7,63 (d, 2H, J=8 Hz), 4,36 (m, 1H), 3,51 (dd, 1H, J=5 Hz, 13 Hz) 3,21 (m, 1H).

Cloridrato de etil 2(S)-(4-iodo-fenilsulfonilamino)-β-alanina (A-4)

Fez-se borbulhar HCl gasoso rapidamente através

de uma suspensão do ácido A-3 (4,0 g, 10,81 mmol) em EtOH (50 mL) a 0°C durante 10 minutos. O banho de arrefecimento foi removido e a reacção foi aquecida a 60°C. Após 18 h, a reacção foi concentrada para dar éster A-4 como um sólido branco.

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ 7,98 (d, 2H, J=8 Hz), 7,63 (d, 2H, J=8 Hz), 4,25 (q, 1H, J=5 Hz), 3,92 (m, 2H), 3,33 (m, 1H), 3,06 (m, 1H), 1,01 (t, 3H, J=7 Hz).

4-[2-(2-Aminopiridin-6-il)etil]benzoato de etilo (A-5a)

Uma mistura de éster A-5 (700 mg, 2,63 mmol) (para a preparação, ver: Esquema 29 da Publicação do Pedido Internacional PCT Nº WO 95/32710, publicada em 7 de Dezembro de 1995), Pd/C a 10% (350 mg) e EtOH foi agitada a 1 atm de H<sub>2</sub>. Após 20 h, a reacção foi filtrada através de uma camada de celite e depois concentrada para dar éster A-5a como um óleo castanho.

TLC R<sub>f</sub> = 0,23 (sílica, 40% de EtOAc/hexanos).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,95 (d, 2H, J=8 Hz), 7,26 (m, 3H), 6,43 (d, 1H, J=7 Hz), 6,35 (d, 1H, J=8 Hz), 4,37 (m, 4H), 3,05 (m, 2H), 2,91 (m, 2H), 1,39 (t, 3H, J=7 Hz).

Cloridrato do ácido 4-[2-(2-aminopiridin-6-il)etil]benzóico (A-6)

Uma suspensão de éster A-5a (625 mg, 2,31 mmol)

em HCl 6 N (12 mL) foi aquecida a 60°C. Após 20 h, a reacção foi concentrada para dar ácido A-6 como um sólido castanho dourado.

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7,96 (d, 2H, J=8 Hz), 7,80 (m, 1H), 7,33 (d, 2H, J=8 Hz), 6,84 (d, 1H, J=9 Hz), 6,69 (d, 1H, J=7 Hz), 3,09 (m, 4H).

Etil 4-[2-(2-aminopiridin-6-il)etil]benzoíl-2(S)-(4-iodofenilsulfonilamino)- $\beta$ -alanina (A-7)

Uma solução de ácido 15-6 (400 mg, 1,43 mmol), amina A-4 (686 mg, 1,57 mmol), EDC (358 mg, 1,86 mmol), HOBT (252 mg, 1,86 mmol), NMM (632  $\mu$ L, 5,72 mmol) em DMF (10 mL) foi agitada durante 20 h. A reacção foi diluída com EtOAc e depois lavada com NaHCO<sub>3</sub> saturado, solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca (MgSO<sub>4</sub>) e concentrada. A cromatografia rápida (sílica, EtOAc depois 5% de isopropanol/EtOAc) deu amida A-7 como um sólido branco.

TLC R<sub>f</sub> = 0,4 (sílica, 10% de isopropanol/EtOAc).

$^1\text{H}$  NMR (300 MHz, CD<sub>3</sub>OD)  $\delta$  7,79 (d, 2H, J=9 Hz), 7,61 (d, 2H, J=8 Hz), 7,52 (d, 2H, J=9 Hz), 7,29 (m, 1H), 7,27 (d, 2H, J=8 Hz), 4,20 (m, 1H), 3,95 (q, 2H, J=7 Hz), 3,66 (dd, 1H, J=6 Hz, 14 Hz), 3,49 (dd, 1H, J=8 Hz, 13 Hz), 3,01 (m, 2H), 2,86 (m, 2H), 1,08 (t, 3H, J=7 Hz).

4-[2-(2-Aminopiridin-6-il)etil]benzoíl-2(S)-(4-iodofenil-sulfonilamino)-β-alanina (A-8)

Uma solução de éster A-7 (200 mg, 0,3213 mmol) e HCl 6 N (30 mL) foi aquecida a 60°C. Após 20 h, a mistura reaccional foi concentrada. A cromatografia rápida (sílica, 20:20:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O) deu ácido A-8 como um sólido branco.

TLC R<sub>f</sub> = 0,45 (sílica, 20:20:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8,40 (m, 1H), 8,14 (Bs, 1H), 7,81 (d, 2H, J=8 Hz), 7,62 (d, 2H, J=8 Hz), 7,48 (d, 2H, J=8 Hz), 7,27 (m, 3H), 6,34 (d, 1H, J=7 Hz), 6,25 (d, 1H, J=8 Hz), 5,85 (bs, 2H), 3,89 (bs, 1H), 3,35 (m, 2H), 2,97 (m, 2H), 2,79 (m 2H).

4-[2-(2-Aminopiridin-6-il)etil]benzoíl-2(S)-(4-trimetil-estanil-fenilsulfonilamino-β-alanina (A-9)

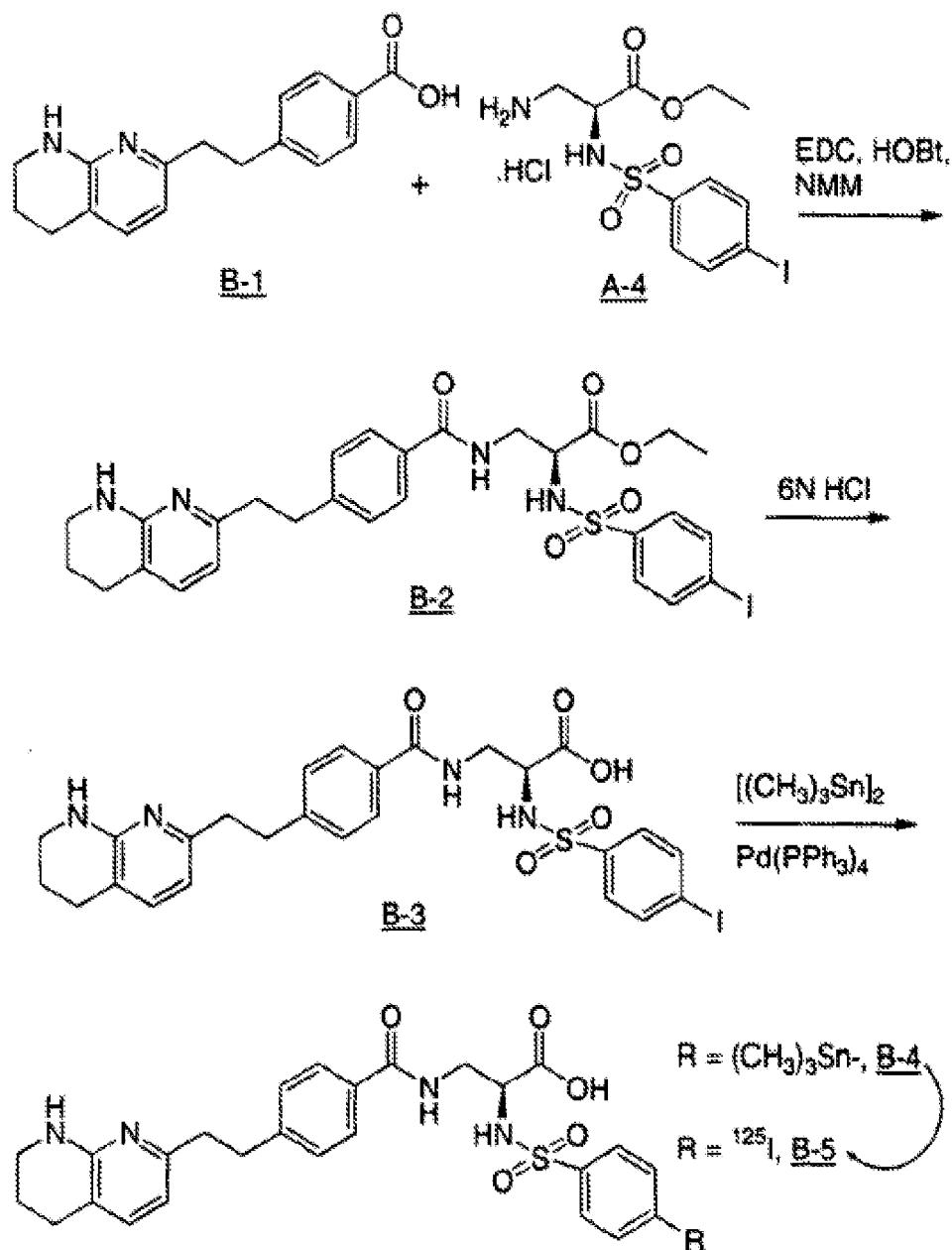
Uma solução de iodeto A-8 (70 mg, 0,1178 mmol), [(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>Sn]<sub>2</sub> (49 μL, 0,2356 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (5 mg) e dioxano (7 mL) foi aquecida a 90°C. Após 2 h, a reacção foi concentrada e depois purificada por HPLC preparativa (Delta-Pak C18 15 μM 100 Å, 40 x 100 mm; 95:5 depois 5:95 de H<sub>2</sub>O/CH<sub>3</sub>CN) para dar o sal trifluoroacetato. O sal foi suspenso em H<sub>2</sub>O (10 mL), tratado com NH<sub>4</sub>OH (5 gotas) e depois liofilizado para dar amida A-9 como um sólido branco.

<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, DMSO) δ 8,40 (m, 1H), 8,18 (d, 1H, J=8 Hz), 7,67 (m, 5H), 7,56 (d, 2H, J=8 Hz), 7,29 (d, 2H, J=8 Hz), 6,95-7,52 (m, 2H), 6,45 (bs, 2H), 4,00 (m, 1H), 3,50 (m, 1H), 3,33 (m, 1H), 2,97 (m, 2H), 2,86 (m, 2H).

4-[2-(2-Aminopiridin-6-il)etil]benzoíl-2(S)-4-<sup>125</sup>iodo-fenil-sulfonilamino-β-alanina (A-10)

Adicionou-se um IODO-bead® (reagente de iodação da Pierce) a um frasco de transporte de 5 mCi de Na<sup>125</sup>I (Amersham, IMS30) e agitou-se durante cinco minutos à temperatura ambiente. Preparou-se uma solução de 0,1 mg de A-9 em 0,05 mL de 10% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>/MeOH e foi imediatamente adicionada ao frasco com Na<sup>125</sup>I/IODO-bead®. Após agitação durante três minutos à temperatura ambiente, adicionou-se aproximadamente 0,04-0,05 mL de NH<sub>4</sub>OH para que a mistura ficasse a pH 6-7. Toda a mistura reaccional foi injectada no HPLC para purificação [coluna Vydac C18 péptido-proteína, 4,6 x 250 mm, gradiente linear de 10% de acetonitrilo (0,1% (TFA):H<sub>2</sub>O (0,1% de TFA) até 90% de acetonitrilo (0,1% de TFA):H<sub>2</sub>O (0,1% de TFA) ao longo de 30 minutos, 1 mL/min]. O tempo de retenção de A-10 é 17 minutos nestas condições. As fracções contendo a maioria da radioactividade foram combinadas, liofilizadas e diluídas com etanol para dar aproximadamente 1 mCi de A-10, que co-eluiu na análise por HPLC com uma amostra autêntica de A-8.

## ESQUEMA B

Síntese do Radioligando para o Ensaio SPAV5

Éster etílico do ácido 2(S)-(4-iodo-benzenossulfonilamino)-3-{4-[2-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-etyl]-benzoílamino}-propiónico (B-2)

Uma mistura de B-1 (0,23 g, 0,72 mmol; para a

preparação ver patente U.S. Nº 5 741 796), A-4 (0,343 g, 0,792 mmol), EDC (0,179 g, 0,93 mmol), HOBT (0,126 g, 0,93 mmol), NMM (0,316 mL, 2,86 mmol) em acetonitrilo (3 mL) e DMF (3 mL) foi agitada durante 2 horas à temperatura ambiente e depois foi diluída com acetato de etilo, lavada com água, NaHCO<sub>3</sub> aquoso saturado e solução aquosa saturada de cloreto de sódio, seca sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrada. O resíduo foi cromatografado em gel de sílica (70:25:5 de CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH) para dar B-2 como um sólido branco:

TLC R<sub>f</sub> = 0,22 (sílica, 70:25:5 de CHCl<sub>3</sub>/EtOAc/MeOH).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,79 (d, 2H, J=8 Hz), 7,63 (d, 2H, J=8 Hz), 7,54 (d, 2H, J=8 Hz), 7,27 (d, 2H, J=8 Hz), 7,04 (d, 1H, J=7 Hz), 6,60 (m, 1H), 6,29 (d, 1H J=7 Hz), 4,83 (br s, 1H), 4,09 (m, 3H), 3,84 (m, 1H), 3,68 (m, 1H), 3,42 (m, 2H), 3,01 (m, 4H), 2,86 (m, 4H), 2,69 (t, 2H, J=6 Hz), 1,88 (m, 2H).

Ácido 2(S)-(4-iodo-benzenossulfonilamino)-3-{4-[2-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-etil]-benzoílamino}-propiónico (B-3)

Uma mistura de B-2 (0,38 g, 0,573 mmol) e HCl 6 N (50 mL) foi agitada durante 14 horas a 60°C. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura foi concentrada e o resíduo cromatografado em gel de sílica (25:10:1:1 até 15:10:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O) para dar B-3 como um sólido branco.

TLC R<sub>f</sub> = 0,43 (sílica, 10:10:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,42 (m, 1H), 7,79 (d, 2H, J=8

Hz), 7,63 (d, 2H, J=8 Hz), 7,44 (d, 2H, J=8 Hz), 7,27 (d, 2H, J=8 Hz), 7,10 (d, 1H, J=7 Hz), 6,58 (br s, 1H), 6,32 (d, 1H, J=7 Hz), 3,96 (m, 1H), 3,51 (m, 1H), 3,30 (m, 5H), 2,96 (m, 2H), 2,78 (m, 2H), 2,62 (m, 2H), 1,77 (m, 2H).

HRMS: Para C<sub>26</sub>H<sub>27</sub>IN<sub>4</sub>O<sub>5</sub>S, previsto 635,0818, determinado 635,0831.

Ácido 3-{4-[2-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-etil]-benzoílamino}-2(S)-(4-trimetilestananil-benzenossulfonil-amino)-propiónico (B-4)

Uma mistura de B-3 (0,10 g, 0,16 mmol), hexametildiestanano (0,065 mL, 0,32 mmol), Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> e dioxano (10 mL) foi agitada durante uma hora a 90°C. Após arrefecimento até à temperatura ambiente, a mistura foi concentrada e o resíduo cromatografado em gel de sílica (50:10:1:1 até 25:10:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O) para dar B-4 como um sólido branco.

TLC R<sub>f</sub> = 0,48 (sílica, 15:10:1:1 de EtOAc/EtOH/NH<sub>4</sub>OH/H<sub>2</sub>O).

<sup>1</sup>H NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 8,38 (m, 1H), 8,14 (m, 1H), 7,63 (m, 4H), 7,28 (d, 2H, J=8 Hz), 7,08 (d, 1H, J=7 Hz), 6,50 (br s, 1H), 6,28 (d, 1H, J=7 Hz), 3,96 (m, 1H), 3,48 (m, 1H), 3,31 (m, 5H), 2,96 (m, 2H), 2,78 (m, 2H), 2,62 (m, 2H), 1,77 (m, 2H), 0,28 (s, 9H).

Espectro de massa de alta resolução: Para C<sub>29</sub>H<sub>36</sub>N<sub>4</sub>O<sub>5</sub>SSn, prevista 665,1533 (<sup>112</sup>Sn) e 673,1507 (<sup>120</sup>Sn), determinada 665,1510 e 673,1505.

Ácido 2(S)-(4-<sup>125</sup>iodo-benzenossulfonilamino)-3-{4-[2-(5,6,7,8-tetra-hidro-[1,8]naftiridin-2-il)-etyl]-benzoílamino}-propiónico (B-5)

Uma barra de agitação, metanol (0,05 mL) e um IODO-bead®(Pierce) foram adicionados a um frasco de transporte de Na<sup>125</sup>I (10 mCi, Amersham, IMS300) e agitados durante cinco minutos à temperatura ambiente. Preparou-se uma solução de B-4 (0,1 mg) em metanol (0,04 mL) e adicionou-se uma porção (0,02 mL) a uma mistura de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (0,005 mL) em metanol (0,025 mL), e adicionou-se esta solução imediatamente ao frasco de Na<sup>125</sup>I/IODO-bead®. Após agitação durante dois minutos à temperatura ambiente, a reacção foi desactivada com NH<sub>4</sub>OH (0,04-0,05 mL) e toda a mistura reaccional foi injectada no HPLC para purificação [coluna Vydac C-18 péptido-proteína, 4,6 x 250 mm, gradiente linear de 10% de acetonitrilo:H<sub>2</sub>O (0,1% de TFA) até 90% de acetonitrilo:H<sub>2</sub>O (0,1% de TFA) ao longo de 20 minutos, 1 mL/min]. O tempo de retenção de B-5 é 16 minutos nestas condições. As fracções contendo a maioria da radioactividade foram combinadas, liofilizadas e diluídas com etanol para dar aproximadamente 1 mCi de B-5, que coluiu na análise por HPLC com uma amostra autêntica de B-3.

Instrumentação: A HPLC analítica e preparativa foi realizada utilizando um sistema de administração de multi solventes Waters 600E Powerline com cabeças de 0,1 mL com um injector Rheodyne 7125 e um detector de fotodíodos Waters 990 com um colector de microfracções Gilson FC203.

Para HPLC analítica e preparativa, utilizou-se uma coluna Vydac C-18 péptido-proteína, 4,6 x 250 mm com uma pré-coluna modular Brownlee C-18. O acetonitrilo utilizado para as análises por HPLC foi Fisher de qualidade Optima. O radiodetector de HPLC utilizado por um detector de radioisótopos Beckman 170. Foi utilizada uma coluna Vydac C-18 proteína e péptido, 3,9 x 250 mm para HPLC analítica e preparativa. As soluções com radioactividade foram concentradas utilizando uma centrífuga de vácuo Speedvac. As curvas de calibração e concentrações químicas foram determinadas utilizando um espectrofotómetro de díodos UV/Vis Hewlett Packard Modelo 8452A. As radioactividades das amostras foram determinadas num contador gama Packard A5530.

Os procedimentos de ensaio utilizados para medir a ligação a  $\alpha\text{v}\beta 3$  e  $\alpha\text{v}\beta 5$  e a actividade inibidora da reabsorção óssea dos compostos da presente invenção estão descritos a seguir.

#### ENSAIO DAS LACUNAS DE REABSORÇÃO ÓSSEA

Quando os osteoclastos se ocupam da reabsorção óssea, podem provocar a formação de lacunas na superfície do osso sobre o qual estão a actuar. Portanto, quando se testa compostos quanto à sua capacidade para inibir osteoclastos, é útil medir a capacidade dos osteoclastos de escavar estas lacunas de reabsorção quando está presente o composto inibidor.

Cortes consecutivos com 200 micrometros de espessura de um cilindro de 6 mm de diáfise de fémur de bovino são preparados com uma serra de diamante a baixa velocidade (Isomet, Beuler, Ltd., Lake Bluff, Ill.). As secções de osso são combinadas, colocadas numa solução de etanol a 10% e refrigeradas até à utilização.

Antes da experimentação, as secções de osso de bovino são ultrassonicadas duas vezes, 20 minutos cada em H<sub>2</sub>O. As secções limpas são colocadas em placas com 96 poços de tla modo que ficam disponíveis duas filas de controlo e uma fila para cada dosagem de fármaco. Cada fila representa culturas em triplicado ou quadruplicado. As secções de osso em placas com 96 poços são esterilizadas por irradiação com UV. Antes da incubação com osteoclastos, as secções de osso são hidratadas pela adição de 0,1 mL de αMEM, pH 6,9 contendo 5% de soro fetal de bovino e 1% de penicilina/estreptomicina.

Ossos longos de coelhos (New Zealand White Hare) com 7-14 dias são dissecados, limpos dos tecidos moles e colocados em αMEM contendo HEPES a 20 mM. Os ossos são picados utilizando uma tesoura até os pedaços serem <1 mm e são transferidos para um tubo de 50 mL num volume de 25 mL. O tubo é suavemente balançado manualmente durante 60 ciclos, o tecido é sedimentado durante 1 min e o sobrenadante é removido. Adiciona-se outros 25 mL de meio ao tecido balança-se de novo. O segundo sobrenadante é combinado com o primeiro. Conta-se o número de células

excluindo eritrócitos (tipicamente  $2 \times 10^7$  células/mL). Prepara-se uma suspensão de células consistindo em  $5 \times 10^6$ /mL em αMEM contendo 5% de soro fetal de bovino,  $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$  a 10 nM e penicilina-estreptomicina. Adiciona-se alíquotas de 200 mL às secções de osso de bovino (200 mm x 6 mm) e incuba-se durante 2 h a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. O meio é retirado cuidadosamente com um micropipetador e adiciona-se meio fresco contendo composto de teste. As culturas são incubadas durante 48 h e quantificadas quanto a c-telopéptido (fragmentos da cadeia al de colagénio de tipo I) por Crosslaps para meios de cultura (Herlev, Dinamarca).

As secções de osso de bovino são expostas a osteoclastos durante 20-24 h e são processadas por coloração. O meio de cultura de tecidos é removido de cada secção de osso. Cada poço é lavado com 200 mL de H<sub>2</sub>O e as secções de osso são então fixadas durante 20 minutos em glutaraldeído a 2,5%, cacodilato 0,1 M, pH 7,4. Após a fixação, quaisquer detritos celulares remanescentes são retirados por ultrassonicação durante 2 min na presença de NH<sub>4</sub>OH 0,25 M seguida por ultrassonicação durante 2 x 15 min em H<sub>2</sub>O. As secções de osso são imediatamente coradas durante 6-8 min com 1% de azul de toluidina e 1% de bórax filtrados.

Depois de as secções de osso terem secado, as lacunas de reabsorção são contadas em secções de teste e de controlo. As lacunas de reabsorção são observadas num microscópio de fluorescência Microphot Fx (Nikon)

utilizando um cubo de filtração polarizante Nikon IGS. Os resultados de dosagem dos ensaios são comparados com controlos e determina-se os valores resultantes da IC<sub>50</sub> para cada composto testado.

A adequação da extrapolação de dados deste ensaio para estados patológicos de mamíferos (incluindo seres humanos) é apoiada pelos ensinamentos que se encontram em Sato, M. et al., *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 5, No. 1, pp. 31-40, 1990, que aqui é dado como integralmente incorporado por citação. Este artigo refere que certos bisfosfonatos foram utilizados clinicamente e parecem ser eficazes no tratamento da doença de Paget, hipercalcemia maligna, lesões osteolíticas produzidas por metástases e perda de massa óssea devida a imobilização ou deficiência de hormonas sexuais. Estes mesmos bisfosfonatos são então testado ensaio das lacunas de reabsorção descrito acima para confirmar uma correlação entre a sua utilidade conhecida e o desempenho positivo no ensaio.

#### ENSAIO EIB

Duong et al., *J. Bone Miner. Res.*, 8:S378 (1993), descrevem um sistema para exprimir a integrina αvβ3 humana. Foi sugerido qye a integrina estimula a fixação de osteoclastos à matriz óssea, uma vez que anticorpos contra a integrina, ou moléculas contendo RGD, tais como equistatina (Patente Europeia 382 451), podem efectivamente bloquear a reabsorção óssea.

## Mistura Reaccional:

1. 175 µL de tampão TBS (Tris.HCl 50 mM pH 7,2, NaCl 150 mM, BSA a 1%, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM).
2. 25 mL de extracto de células (diluir com tampão de octilglucosido 100 mM para dar 2000 cpm/25 µL).
3. <sup>125</sup>I-equistatina (25 µL/50.000 cpm) (ver EP 382 451).
4. 25 µL de tampão (ligação total) ou equistatina não marcada (ligação não específica).

A mistura reaccional foi então incubada durante 1 h à temperatura ambiente. A  $\alpha\text{v}\beta 3$  não ligada e ligada foram separadas por filtração utilizando um colector de células Skatron. Os filtros (pré-humedecidos em poli-etilenoimina a 1,5% durante 10 min) foram então lavados com o tampão de lavagem (Tris HCl 50 mM, CaCl<sub>2</sub>/MgCl<sub>2</sub> 1 mM, pH 7,2). O filtro foi então contado num contador gama.

ENSAIO SPAV3MATERIAIS:

1. Pérolas de aglutinina de gérmão de trigo para Ensaio de Proximidade de Cintilação (SPA): Amersham
2. Octilglucopiranosoído: Calbiochem
3. HEPES: Calbiochem

4. NaCl: Fisher
5. CaCl<sub>2</sub>: Fisher
6. MgCl<sub>2</sub>: SIGMA
7. Fluoreto de fenilmetilsulfonilo (PMSF): SIGMA
8. Optiplate: PACKARD
9. Composto A-10 (actividade específica de 500-1000 Ci/mmole)
10. Composto de teste
11. Receptor de integrina purificado:  $\alpha v\beta 3$  foi purificado a partir de 293 células que exprimem  $\alpha v\beta 3$  (Duong et al., *J. Bone Min. Res.*, **8**:S378, 1993) de acordo com Pytela (*Methods in Enzymology*, **144**:475, 1987)
12. Tampão de ligação: HEPES 50 mM, pH 7,8, NaCl 100 mM, Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 1 mM, PMSF 0,5 mM
13. Octilglucosido 50 mM em tampão de ligação: tampão 50-OG

**PROCEDIMENTO:****1. Pré-tratamento de pérolas de SPA:**

500 mg de pérolas de SPA liofilizadas foram primeiro lavadas quatro vezes com 200 mL de tampão 50-OG e uma vez com 100 mL de tampão de ligação, e depois ressuspensas em 12,5 mL de tampão de ligação.

**2. Preparação de mistura de pérolas de SPA e receptor**

Em cada tubo de teste, foram suspensos 2,5  $\mu$ L (40

mg/mL) de pérolas pré-tratadas em 97,5 µL de tampão de ligação e 20 mL de tampão 50-OG. Adicionou-se então 5 mL (~30 ng/µL) de receptor purificado às pérolas em suspensão com agitação à temperatura ambiente durante 30 minutos. A mistura foi então centrifugada a 2.500 rpm numa centrífuga de bancada Beckman GPR durante 10 minutos a 4°C. Os sedimentos foram então ressuspensos em 50 µL de tampão de ligação e 25 µL de tampão 50-OG.

### 3. Reacção

Os seguintes produtos foram adicionados sequencialmente à Optiplate nos poços correspondentes:

- (i) Mistura de receptor/pérolas (75 µL)
- (ii) 25 µL de cada um dos seguintes: composto a ser testado, tampão de ligação para ligação total ou A-8 para ligação não específica (concentração final de 1 µM)
- (iii) A-10 em tampão de ligação (25 µL, concentração final de 40 pM)
- (iv) Tampão de ligação (125 µL)
- (v) Cada placa foi selada com selante de placas de PACKARD e incubada de um dia para o outro com agitação a 4°C.

4. As placas foram contadas utilizando um TOPCOUNT da PACKARD

5. A % de inibição foi calculada como se segue:

A = contagens totais

B = contagens não específicas

C = contagens da amostra

$$\% \text{ de inibição} = [\{(A-B)-(C-B)\}/(A-B)]/(A-B) \times 100$$

Compostos representativos da presente invenção foram testados e verificou-se que se ligam a integrina  $\alpha v \beta 3$  humana. Verificou-se que estes compostos genericamente tinham valores da IC<sub>50</sub> inferiores a cerca de 100 nM no ensaio SPAV3.

#### ENSAIO OCFORM

Células semelhantes a osteoblastos (1,8 células), originalmente derivados de calotas cranianas de murganho, foram plaqueadas em placas para cultura de tecidos com 24 poços CORNING em meio  $\alpha$ MEM contendo ribo- e desoxirribonucleosidos, soro fetal de bovino a 10% e penicilina-estreptomicina. As células foram semeadas a 40.000/poço pela manhã. À tarde, foram preparadas células de medula óssea a partir de murganhos Balb/C com seis semanas de idade como a seguir:

Os murganhos foram sacrificados, as tibias retiradas e colocadas no meio acima referido. As extremidades foram retiradas por corte e a medula foi extraída da cavidade para um tubo com uma seringa de 1 mL

com uma agulha de calibre 27,5. A medula foi suspensa por pipetagem para cima e para baixo. A suspensão foi passada através de um coador de células de nylon com >100 µm. A suspensão resultante foi centrifugada a 350 x g durante sete minutos. O sedimento foi ressuspenso e uma amostra foi diluída em ácido acético a 2% para lisar os glóbulos vermelhos. As células remanescentes foram contadas num hemacitómetro. As células foram sedimentadas e ressuspensas a  $1 \times 10^6$  células/mL. Adicionou-se 50 µL a cada poço de 1,8 células para dar 50.000 células/poço e adicionou-se 1,25-di-hidroxi-vitamina D<sub>3</sub> (D<sub>3</sub>) a cada poço até uma concentração final de 10 nM. As culturas foram incubadas a 37°C em atmosfera húmida com 5% de CO<sub>2</sub>. Após 48 h, o meio foi mudado. 72 h após a adição de medula óssea, os compostos de teste foram adicionados com meio fresco contendo D<sub>3</sub> a poços em quadruplicado. Os compostos foram novamente adicionados após 48 h com meio fresco contendo D<sub>3</sub>. Após mais 48 h, o meio foi removido, as células foram fixadas com formaldeído a 10% em soro fisiológico tamponado com fosfato durante 10 minutos à temperatura ambiente, seguido por um tratamento de 1-2 minutos com etanol:acetona (1:1) e secas ao ar. As células foram então coradas com fosfatase ácida resistente a tartarato como se segue:

As células foram coradas durante 10-15 minutos à temperatura ambiente com tampão acetato 50 mM, pH 5,0 contendo tartarato de sódio 30 mM, 0,3 mg/mL de Fast Red Violet LB Salt (corante para imunocitoquímica) e 0,1 mg/mL de Naftol AS-MX fosfato. Após a coloração, as placas foram

intensamente lavadas com água desionizada e secas ao ar. Foi contado o número de células coradas positivas, multinucleares, em cada poço.

ENSAIO SPAV5MATERIAIS:

1. Pérolas de aglutinina de gérmen de trigo para Proximidade de Cintilação (SPA): Amersham
2. Octilglucopiranosido e 12-miristato-13-acetato de forbol (PMA): Calbiochem
3. Tris-HCl, NaCl e CaCl<sub>2</sub>: Fisher
4. Meio Essencial Mínimo (MEM): Gibco/BRL
5. Soro fetal de bovino (FBS): Hyclone
6. MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub> e fluoreto de fenilmethylsulfônico (PMSF): SIGMA
7. Comprimidos de mistura de inibidor de proteases: Boehringer Mannheim.
8. Optiplate com 96 poços: PACKARD
9. B-5 foi utilizado como um ligando radiomarcado (actividade específica de 500-1000 Ci/mmol) e B-3 (2,5 µM) foi utilizado para se obter 100% de inibição.
10. Composto de teste.
11. Células HEK293 que sobre-exprimem integrinas αvβ5 (Simon et al., *J. Biol. Chem.* **272**, 29380-29389, 1997) são cultivadas em placas com 150 mm em meio 10% de FBS/MEM (Gibco/BRL).

12. Tampão de lise: octilglucopiranosido 100 mM, Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, PMSF 0,5 mM e inibidores de protease (1 comprimido/50 mL de tampão).
13. Tampão de ligação: Tris 50 mM, pH 7,5, NaCl 100 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM e MnCl<sub>2</sub> 1 mM.
14. Octilglucopiranosido 50 mM em tampão de ligação: tampão 50-OG

PROCEDIMENTO:1. Lisados de células αvβ5:

Células HEK 293 que exprimem integrinas αvβ5 foram cultivadas até à confluência. As células foram então privadas de um dia para o outro em meio contendo 0,5% de FBS, seguido por tratamento com PMA 100 nM durante 20 min. As células foram lavadas 2 vezes com tampão de soro fisiológico tamponado com fosfato (4°C) e solubilizadas em tampão de lise durante 30 min em gelo. Os lisados foram clarificados utilizando uma Beckman JA-20 a 20.000 x g. A concentração de proteína nos lisados clarificados foi determinada utilizando um micro kit BCA (Pierce) e foram armazenados em alíquotas a 80°C.

2. Pré-tratamento de pérolas de SPA:

500 mg de pérolas de SPA liofilizadas foram primeiro lavadas quatro vezes com 200 mL de tampão 50-OG e

uma vez com 100 mL de tampão de ligação, e depois ressuspensos em 12,5 mL de tampão de ligação.

### 3. Preparação da reacção de ligação de SPAV5

A cada poço de ensaio, foram adicionados sequencialmente a placas Optiplate:

- (i) Tampão de ligação para perfazer um volume final de 125 µL por poço.
- (ii) 3 µL (120 µg/poço) de pérolas pré-tratadas diluídas com 22 µL de Tampão 50-OG
- (iii) 15 µg de proteínas de lisado de células  $\alpha\text{v}\beta 5$ .
- (iv) B-5 a 50.000 cpm.
- (v) 25 µL de concentrações em gradiente de composto de teste.
- (vi) Cada placa foi selada com selante de placas de PACKARD e incubada de um dia para o outro com agitação a 4°C.

4. As placas foram contadas utilizando um contador de cintilações de microplacas PACKARD TOPCOUNT.

5. A % de inibição foi calculada como se segue:

A = contagens totais (ligação do receptor a B-5)

B = contagens não específicas (ligação do receptor a B-5 na presença de 2,5 µM de ligando frio)

C = contagens da ligação do receptor ao composto de teste

$$\% \text{ de inibição} = [\{(A-B)-(C-B)\} / (A-B)] / (A-B) \times 100$$

A IC<sub>50</sub> do composto de teste foi calculada como 50% de inibição.

Compostos representativos da presente invenção foram testados e verificou-se que genericamente tinham valores da IC<sub>50</sub> inferiores 1 µM no ensaio SPAV5.

#### EXEMPLO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Como uma forma de realização específica de uma composição oral, 100 mg de qualquer dos compostos da presente invenção são formulados com lactose finamente dividida suficiente para dar uma quantidade total de 580 a 590 mg para encher uma cápsula de gelatina dura de tamanho 0.

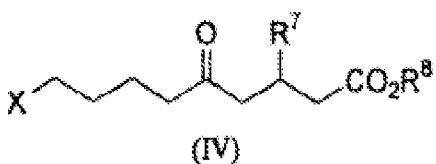
Embora a invenção tenha sido descrita e ilustrada com referência a certas das suas formas de realização preferidas, os especialistas na matéria entenderão que nelas podem ser feitas várias alterações, modificações e substituições. Por exemplo, dosagens eficazes que não as doses preferidas aqui indicadas acima podem ser aplicadas em consequência de variações na capacidade de resposta do mamífero a ser tratado à gravidade de doenças ósseas causadas por reabsorção, ou para outras indicações para os compostos da invenção indicados acima. Analogamente, as respostas farmacológicas específicas observadas podem

variar de acordo com e dependendo do composto activo específico seleccionado ou de se estão presentes veículos farmacêuticos, bem como do tipo de formulação e modo de administração utilizados, e essas variações ou diferenças esperadas nos resultados estão contempladas de acordo com os objectos e práticas da presente invenção.

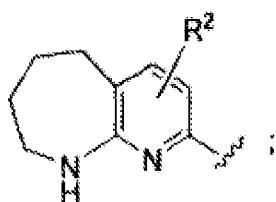
Lisboa, 9 de Outubro de 2007

**REIVINDICAÇÕES**

1. Composto de fórmula (IV)



ou um seu sal farmaceuticamente aceitável, em que X é



R<sup>2</sup> é seleccionado do grupo que consiste em halogéneo, C<sub>1-8</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, C<sub>3-8</sub> ciclo-heteroalquilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> ciclo-heteroalquil-C<sub>1-6</sub> alquilo, arilo, aril-C<sub>1-6</sub> alquilo, amino, C<sub>1-3</sub> acilamino, C<sub>1-3</sub> acilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, amino-C<sub>1-6</sub> alquilo, (C<sub>1-6</sub> alquil)<sub>1-2</sub> amino, C<sub>3-6</sub> cicloalquil-C<sub>0-2</sub> amino, (C<sub>1-6</sub> alquil)<sub>1-2</sub> amino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-6</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alcoxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxcarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxi-carbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxilo, hidroxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, nitro, ciano, trifluorometilo, trifluorometoxi, trifluoroetoxi, C<sub>1-8</sub> alquil-S(O)<sub>0-2</sub>, (C<sub>1-8</sub> alquil)<sub>0-2</sub> aminocarbonilo, C<sub>1-8</sub> alquilocarbonilamino, (C<sub>1-8</sub> alquil)<sub>1-2</sub> aminocarbonilo-xi, (aril-C<sub>1-3</sub> alquil)<sub>1-2</sub> amino, (aril)<sub>1-2</sub> amino, aril-C<sub>1-3</sub> alquilsulfonilamino e C<sub>1-8</sub> alquilsulfonilamino;

R<sup>7</sup> é arilo em que o grupo arilo é seleccionado do grupo que consiste em

- (1) fenilo,
- (2) naftilo,
- (3) piridilo,
- (4) furilo,
- (5) tienilo,
- (6) pirrolilo,
- (7) oxazolilo,
- (8) tiazolilo,
- (9) imidazolilo,
- (10) pirazolilo,
- (11) isoxazolilo,
- (12) isotiazolilo,
- (13) pirimidinilo,
- (14) pirazinilo,
- (15) piridazinilo,
- (16) tetrazolilo,
- (17) quinolilo,
- (18) isoquinolilo,
- (19) benzimidazolilo,
- (20) benzofurilo,
- (21) benzotienilo,
- (22) indolilo,
- (23) benzotiazolilo,
- (24) benzoxazolilo,
- (25) di-hidrobenzofurilo,

- (26) benzo(1,3)dioxolanilo,
- (27) benzo(1,4)dioxanilo,
- (28) quinazolilo,
- (29) quinoxalilo, e
- (30) 3,4-di-hidro-2H-1,4-dioxa-5-aza-naftalenilo;

em que o grupo arilo como definido acima nos itens (1) a (30) está não substituído ou substituído com um a três substituintes seleccionados independentemente de hidroxilo, hidroxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, halogéneo, C<sub>1-8</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> ciclo-alquilo, arilo, aril-C<sub>1-3</sub> alquilo, amino, amino C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-3</sub> acilamino, C<sub>1-3</sub> acilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-6</sub> alquilamino, di(C<sub>1-6</sub>)alquilamino, C<sub>1-6</sub> alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, di(C<sub>1-6</sub>)-alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-4</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alquistio, C<sub>1-4</sub> alquilsulfônico, C<sub>1-4</sub> alquilsulfônico, C<sub>1-4</sub> alcoxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonilo, hidroxicarbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> alcoxcarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxcarbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> alquilcarboniloxi, ciano, trifluorometilo, 1,1,1-trifluoroetilo, trifluorometoxi, trifluoroetoxi e nitro; ou dois substituintes adjacentes conjuntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados unem-se para formar um anel com cinco ou seis membros saturado ou insaturado contendo 1 ou 2 heteroátomos seleccionados do grupo que consiste em N, O e S, cujos átomos de carbono do anel podem estar substituídos com oxo ou C<sub>1-3</sub> alquilo; e

R<sup>8</sup> é hidrogénio ou C<sub>1-3</sub> alquilo.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1, em

que R<sup>7</sup> é arilo em que o grupo arilo é seleccionado do grupo que consiste em

fenilo,  
piridilo,  
quinolilo,  
pirimidinilo,  
pirazinilo,  
piridazinilo,  
pirazolilo,  
benzofurilo,  
di-hidrobenzofurilo e  
3,4-di-hidro-2H-1,4-dioxa-5-aza-naftalenilo;

em que o grupo arilo está não substituído ou substituído com um a dois substituintes seleccionados independentemente de hidroxilo, hidroxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, halogéneo, C<sub>1-8</sub> alquilo, C<sub>3-8</sub> cicloalquilo, arilo, aril-C<sub>1-3</sub> alquilo, amino, amino C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-3</sub> acilamino, C<sub>1-3</sub> acil-amino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-6</sub> alquilamino, di(C<sub>1-6</sub>)alquilamino, C<sub>1-6</sub> alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, di(C<sub>1-6</sub>)alquilamino-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-4</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alquiltio, C<sub>1-4</sub> alquilsulfinilo, C<sub>1-4</sub> alquilsulfonilo, C<sub>1-4</sub> alcoxi-C<sub>1-6</sub> alquilo, hidroxicarbonilo, hidroxicarbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> alcoxcarbonilo, C<sub>1-3</sub> alcoxcarbonil-C<sub>1-6</sub> alquilo, C<sub>1-5</sub> alquilcarboniloxi, ciano, trifluorometilo, 1,1,1-trifluoroetilo, trifluorometoxi, trifluoroetoxi e nitro; ou dois substituintes adjacentes conjuntamente com os átomos de carbono aos quais estão ligados unem-se para formar um anel com cinco ou seis membros saturado ou insaturado contendo 1 ou 2 heteroátomos seleccionados do grupo que consiste em N, O e S, cujos

átomos de carbono do anel podem estar substituídos com oxo ou C<sub>1-3</sub> alquilo.

3. Composto de acordo com a reivindicação 2, em que R<sup>7</sup> é quinolilo, piridilo ou pirimidinilo; não substituído ou substituído com um a dois substituintes seleccionados independentemente de halogéneo, fenilo, C<sub>1-4</sub> alquilo, C<sub>3-6</sub> cicloalquilo, C<sub>1-3</sub> alcoxi, amino, C<sub>1-3</sub> alquil-amino, di(C<sub>1-3</sub>) alquilamino, hidroxilo, ciano, trifluorometilo, 1,1,1-trifluoroetilo, trifluorometoxi e trifluoroetoxi.

4. Composto de acordo com a reivindicação 3, em que R<sup>2</sup> é seleccionado do grupo que consiste em

hidrogénio, halogéneo, amino, C<sub>1-4</sub> alquilamino, C<sub>3-6</sub> cicloalquil-C<sub>0-2</sub> alquilamino, ciano, C<sub>1-4</sub> alquilo, ciclopropilo, aril C<sub>1-3</sub> alquilo, C<sub>1-4</sub> acilamino, C<sub>1-4</sub> alcoxi, C<sub>1-4</sub> alquiltio,

aminocarbonilo,  
(C<sub>1-6</sub> alquil)<sub>1-2</sub> aminocarbonilo,  
C<sub>1-4</sub> alcoxcarbonilo,  
trifluorometilo e  
trifluorometoxi.

5. Composto de acordo com a reivindicação 4, em que R<sup>2</sup> é seleccionado do grupo que consiste em hidrogénio, halogéneo, amino, C<sub>1-3</sub> alquilamino, C<sub>3-6</sub> cicloalquilmetilamino, C<sub>1-4</sub> alquilo, ciclopropilo, trifluorometilo e trifluorometoxi.

6. Composto de acordo com a reivindicação 1, em que

R<sup>2</sup> é hidrogénio, C<sub>1-4</sub> alquilo ou ciclopropilo;

R<sup>7</sup> é quinolilo, piridilo ou pirimidinilo, não substituído ou substituído com um substituinte seleccionado de C<sub>1-4</sub> alquilo, C<sub>3-6</sub> cicloalquilo, C<sub>1-3</sub> alcoxi, amino, C<sub>1-3</sub> alquilamino, di(C<sub>1-3</sub>) alquilamino, ciano, trifluorometilo ou trifluorometoxi; e

R<sup>8</sup> é hidrogénio ou C<sub>1-3</sub> alquilo.

7. Composto de acordo com a reivindicação 1 seleccionado do grupo que consiste em:

Ácido 3-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-metil-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-te-tra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-te-tra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(6,7,8,9-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(R)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

Ácido 3(S)-(2-etoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-tetra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

8. Composto de acordo com a reivindicação 7 que é:

Ácido 3(S)-(2-metoxi-pirimidin-5-il)-5-oxo-9-(5,6,7,8-te-tra-hidro-5H-pirido[2,3-b]azepin-2-il)-nonanóico;

ou um seu sal farmaceuticamente aceitável.

9. Composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com qualquer das reivindicações anteriores e um veículo farmaceuticamente aceitável.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9 que comprehende ainda uma substância activa adicional seleccionada do grupo que consiste em

- a) um bisfosfonato orgânico ou um seu sal ou éster farmaceuticamente aceitável,
- b) um modulador do receptor estrogénico,
- c) um modulador do receptor androgénico,
- d) um agente citotóxico/antiproliferativo,
- e) um inibidor de metaloproteinase da matriz,
- f) um inibidor dos factores de crescimento derivados das células da epiderme, derivados de fibroblastos ou derivados de plaquetas,
- g) um inibidor de VEGF,
- h) um anticorpo dirigido contra um factor de crescimento ou de receptor de factor de crescimento,
- i) um inibidor de Flk-1/KDR, Flt-1, Tck/Tie-2 ou Tie-1,
- j) um inibidor de catepsina K,
- k) um secretagogo da hormona do crescimento,
- l) um inibidor da bomba ATPase de protões dos osteoclastos,
- m) um inibidor de activador de plasminogénio do tipo da uroquinase (u-PA),
- n) uma proteína de fusão de anticorpo-interleucina 2 específica de tumores,
- o) um inibidor da HMG-CoA redutase, e
- p) um inibidor da prenilação, tal como um inibidor de farnesil transferase ou um inibidor de geranilgeranil transferase ou um inibidor duplo de farnesil/ geranilgeranil transferase;

e as suas misturas.

11. Composição de acordo com a reivindicação 10, em que a referida substância activa é seleccionada do grupo que consiste em

- a) um bisfosfonato orgânico ou um seu sal ou éster farmaceuticamente aceitável,
- b) um modulador do receptor estrogénico,
- c) um modulador do receptor androgénico,
- d) um inibidor de catepsina K,
- e) um inibidor da HMG-CoA redutase, e
- f) um inibidor da bomba ATPase de protões dos osteoclastos;

e as suas misturas.

12. Composição de acordo com a reivindicação 11, em que o referido bisfosfonato orgânico ou o seu sal ou éster farmaceuticamente aceitável é tri-hidrato de alendronato monossódico.

13. Utilização de um composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 para o fabrico de um medicamento para desencadear um efeito antagonista do receptor de integrina  $\alpha v$ .

14. Utilização de acordo com a reivindicação 13, em que o efeito antagonista do receptor de integrina  $\alpha v$  é um efeito antagonista de  $\alpha v\beta 3$ .

15. Utilização de acordo com a reivindicação 14, em que o efeito antagonista de  $\alpha\beta\beta 3$  é seleccionado do grupo que consiste na inibição da reabsorção óssea, restenose, angiogénesis, retinopatia diabética, degeneração macular, inflamação, artrite inflamatória, doença viral, cancro e crescimento tumoral metastático.

16. Utilização de acordo com a reivindicação 15, em que o efeito antagonista de  $\alpha\beta\beta 3$  é a inibição da reabsorção óssea.

17. Utilização de um composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 para o fabrico de um medicamento para o tratamento ou a prevenção da osteoporose.

18. Utilização de um composto de acordo com qualquer das reivindicações 1 a 8 para o fabrico de um medicamento para o tratamento de um crescimento tumoral em combinação com uma radioterapia.

Lisboa, 9 de Outubro de 2007