

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

(22) Data de pedido: <b>2009.04.09</b>	(73) Titular(es): <b>ASTEX THERAPEUTICS LIMITED</b> <b>436 CAMBRIDGE SCIENCE PARK MILTON PARK</b> <b>CAMBRIDGE CAMBRIDGESHIRE CB4 0QA GB</b>
(30) Prioridade(s): <b>2008.04.11 GB 0806527</b> <b>2008.04.11 US 44256</b>	
(43) Data de publicação do pedido: <b>2011.01.12</b>	(72) Inventor(es): <b>MARTYN FREDERICKSON</b> GB
(45) Data e BPI da concessão: <b>2014.05.21</b> <b>142/2014</b>	(74) Mandatário: <b>ÁLVARO ALBANO DUARTE CATANA</b> <b>AVENIDA MARQUÊS DE TOMAR, Nº 44, 6º 1069-229 LISBOA</b> PT

(54) Epígrafe: **COMPOSTOS FARMACÊUTICOS**

(57) Resumo:

A INVENÇÃO PROPORCIONA UM COMPOSTO DA FÓRMULA (1): OU UM SAL, SOLVATO, N-ÓXIDO OU TAUTÓMERO DESTE; EM QUE R1 É R1A E R2 É R2A; OU R1 É R1B E R2 É R2B; DESDE QUE EM CADA CASO PELO MENOS UM DE R1 E R2 SEJA DIFERENTE DE HIDROGÉNIO; R1A E R2A SÃO IGUAIS OU DIFERENTES E CADA UM É SELECIONADO A PARTIR DE HIDROGÉNIO, ALQUILO C1-4, ALCENILO C2-4 E ALCINILO C2-4 EM QUE O ALQUILO C1-4 É OPCIONALMENTE SUBSTITUÍDO POR ALCOXILO C1-2; R1B E R2B SÃO IGUAIS OU DIFERENTES E SÃO SELECIONADOS A PARTIR DE HIDROGÉNIO, C(O)NR4R5, C(O)R6 E C(O)OR6 EM QUE R6 É ALQUILO C1-4, R4 E R5 SÃO AMBOS ALQUILO C1-4, OU NR4R5 FORMA UM ANEL HETEROCÍCLICO SATURADO DE 4 A 7 MEMBROS CONTENDO OPCIONALMENTE UM SEGUNDO MEMBRO DE ANEL DE HETEROÁTOMOS SELECIONADO A PARTIR DE O, N OU S E FORMAS OXIDADAS DE N E S, SENDO O ANEL HETEROCÍCLICO OPCIONALMENTE SUBSTITUÍDO POR UM OU DOIS GRUPOS ALQUILO C1-4 E/OU UM OU DOIS GRUPOS OXO; E R3 É UM GRUPO (D): EM QUE O ASTERISCO DENOTA O PONTO DE LIGAÇÃO AO ANEL ISOINDOLINA; MAS EXCLUINDO O ÉSTER 5-ACETOXI-4-ISOPROPIL-2-[5-(4-METILPIPERAZIN-1-ILMETIL)-1,3-DI-HIDRO-ISOINDOL-2-CARBONIL]-FENÍLICO DE ÁCIDO ACÉTICO.

**DESCRIÇÃO**  
**"COMPOSTOS FARMACÊUTICOS"**

**Campo Técnico**

Esta invenção refere-se a pró-fármacos de compostos que inibem ou modulam a actividade da proteína de choque térmico 90 (Hsp90), para a utilização dos pró-fármacos no tratamento ou na profilaxia de estados de doença ou condições mediados por Hsp90, e a novos pró-fármacos que se desintegram *in vivo* para dar compostos possuindo actividade inibidora ou moduladora de Hsp90. São também proporcionadas composições farmacêuticas contendo os pró-fármacos.

**Antecedentes da Invenção**

Em resposta a stresses celulares incluindo calor, toxinas, radiação, infecção, inflamação e oxidantes, todas as células produzem um conjunto comum de proteínas de choque térmico (Hsp) (Macario & de Macario 2000). A maioria das proteínas de choque térmico atua como acompanhantes moleculares (chaperonas). As chaperonas ligam-se e estabilizam proteínas em fases intermédias da dobragem e permitem que as proteínas se dobrem nos seus estados funcionais. Hsp90 é a Hsp citosólica mais abundante sob condições normais. Existem duas isoformas humanas de Hsp90, uma forma principal indutível Hsp90 $\alpha$  e uma forma menor expressa constitutivamente Hsp90 $\beta$  e outras duas chaperonas intimamente aparentadas que são restritas na sua localização intracelular (GP96/GRP94 do retículo endoplasmático; TRAP1 mitocondrial). O termo Hsp90 como aqui usado inclui todos estes análogos, a menos que

indicado. Hsp90 liga-se a proteínas num estado tardio de dobragem e distingue-se de outras Hsp por a maioria dos seus substratos proteicos estarem envolvidos em transdução de sinal. Hsp90 tem um local de ligação ao ATP distinto, incluindo uma dobra de Bergerat característica de girase bacteriana, topoisomerasas e histidina-cinases. Foi mostrado que o ATP ligado ao bolso N-terminal de Hsp90 é hidrolisado. Esta actividade ATPásica resulta numa alteração conformacional em Hsp90 que é necessária para permitir alterações conformacionais na proteína cliente.

Um domínio de dimerização e um segundo sítio de ligação ao ATP, que pode regular a actividade ATPásica, são verificados próximos do terminal C de Hsp90. A dimerização de Hsp90 parece crítica para a hidrólise de ATP. A activação de Hsp90 é ainda regulada através de interacções com uma variedade de outras proteínas chaperonas e pode ser isolada em complexo com outras chaperonas incluindo Hsp70, Hip, Hop, p23, e p50cdc37. Foi demonstrado que muitas outras proteínas co-chaperonas se ligam a Hsp90. Emergiu um modelo simplificado em que a ligação de ATP ao bolso amino-terminal altera a conformação de Hsp90 para permitir a associação com um complexo multichaperona. Primeiro, a proteína cliente é ligada a um complexo Hsp70/Hsp40. Este complexo associa-se então a Hsp90 através de Hop. Quando o ADP é substituído por ATP, a conformação da Hsp90 é alterada, Hop e Hsp70 são libertadas e é recrutado um conjunto diferente de co-chaperonas incluindo p50cdc37 e p23. A hidrólise de ATP resulta na libertação destas co-chaperonas e da proteína cliente do complexo maduro. Os antibióticos de ansamicina herbimicina, geldanamicina (GA) e 17-alilamino-17-desmetoxigeldanamicina (17-AAG) são inibidores do local de ligação ao ATP que bloqueiam a

ligação do ATP e impedem a conversão para o complexo maduro (Grenert et al., 1997. *J. Biol. Chem.*, 272: 23834-23850).

Apesar de Hsp90 ser expressa ubiquamente, a GA tem uma afinidade de ligação mais elevada para Hsp90 derivada de linhas de células tumorais vs. normais (Kamal et al., *Nature* 2003; 425: 407-410). GA mostra também uma actividade citotóxica mais potente em células tumorais e é sequestrada a concentrações mais elevadas dentro de tumores em modelos de xenoenxerto de ratinho (Brazidec, *J. Med. Chem.* 2004, 47: 3865-3873). Além disso, a actividade ATPásica de Hsp90 é elevada em células de cancro e é uma indicação do nível aumentado de stresse nestas células. A amplificação do gene de Hsp90 foi também relatada como ocorrendo em estádios mais avançados de cancro (Jolly e Morimoto *JNCI* vol. 92, No. 19, 1564-1572, 2000).

A maior instabilidade genética associada ao fenótipo de cancro leva a um aumento da produção de proteínas não nativas ou mutantes. A via da ubiquitina serve também para proteger a célula de proteínas não nativas ou mal dobradas, direccionando estas proteínas para degradação proteossómica. As proteínas mutantes são, pela sua natureza, não nativas e têm portanto o potencial de mostrar instabilidade estrutural e uma maior exigência para o sistema de chaperonas. (Giannini, et al., *Mol. Cell Biol.* 2004; 24 (13): 5667-76).

Existem algumas provas de que Hsp90 se encontra principalmente dentro de complexos multichaperonas "activados" nas células tumorais, em oposição a complexos "latentes" em células normais. Um componente do complexo multichaperonas é a co-chaperona cdc37. Cdc37 liga-se a

Hsp90 na base do local de ligação ao ATP e pode afectar as taxas de dissociação de inibidores ligados a Hsp90 no estado "activado" (Roe *et al.*, Cell 116, (2004), págs. 87-98). Crê-se que a proteína cliente ligada à forma Hsp90-Hsp70 do complexo de chaperonas seja mais susceptível a ubiquitinação e direccionamento para o proteossoma para degradação. Ubiquitina-ligases E3 foram identificadas com motivos interagindo com chaperonas e mostrou-se que um deles (CHIP) promove a ubiquitinação e degradação de proteínas clientes de Hsp90 (Connell *et al.*, 2001. Xu *et al.*, 2002).

#### Proteínas clientes de Hsp90

O número de proteínas clientes de Hsp90 relatado já ultrapassa 100. Uma vez que muitas das suas proteínas clientes estão envolvidas na sinalização da proliferação e sobrevivência celulares, a Hsp90 tem recebido grande interesse como alvo em oncologia. Dois grupos de proteínas clientes, proteína-cinases de sinalização celular e factores de transcrição, sugerem em particular que a regulação de Hsp90 pode ter um benefício potencial como uma terapia anticancro.

Proteína-cinases clientes da proteína Hsp90 implicadas na proliferação e sobrevivência celulares incluem as seguintes:

#### c-Src

A Src celular (c-Src) é uma tirosina-cinase de receptores, necessária para mitogénese iniciada através de múltiplos receptores de factores de crescimento, incluindo os

receptores para o factor de crescimento epidérmico (EGFR), o factor de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR), o factor estimulante de colónias-1 (CSF-1R), e o factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGFR). c-Src é também sobre-expressa e activada em muitos dos mesmos carcinomas humanos que sobre-expressam EGFR e ErbB2. Src é também necessária para a manutenção da homeostasia óssea normal através da sua regulação da função dos osteoclastos.

#### p185erbB2

ErbB2 (Her2/neu) é uma tirosina-cinase receptora sobre-expressa numa variedade de malignidades incluindo cancro da mama, do ovário, da próstata, e gástrico. ErbB2 foi originalmente identificado como um oncogene e a inibição de Hsp90 resulta na poli-ubiquitinação e degradação de erbB2.

#### Cinase mitótica polo

As cinases semelhantes a polo (Plk) são importantes reguladores da progressão do ciclo celular durante a fase M. As Plk estão envolvidas na montagem do aparelho do fuso mitótico e na activação de complexos CDK/ciclina. A Plk1 regula a desfosforilação da tirosina das CDK através de fosforilação e activação de Cdc25C. A activação de CDK1 leva por sua vez à formação do fuso e à entrada na fase M.

#### Akt (PKB)

Akt está envolvida em vias que regulam o crescimento celular através da estimulação da proliferação celular e supressão da apoptose. A inibição de Hsp90 por ansamicinas resulta numa redução da semivida de Akt através de

ubiquitinação e degradação proteossómica. A ligação de Cdc37 a Hsp90 também é necessária para a sub-regulação de Akt. Após tratamento com ansamicina, as células de cancro param na fase G2/M do ciclo celular 24 horas após o tratamento e prosseguem para apoptose 24-48 horas mais tarde. As células normais também param 24 horas após o tratamento com ansamicina, mas não avançam para apoptose.

#### c-Raf, B-RAF, Mek

A via de RAS-RAF-MEK-ERK-MAP-quinase medeia respostas celulares a sinais de crescimento. RAS está mutada numa forma oncogénica em aproximadamente 15% dos cancros humanos. Os três genes de RAF são serina/treonina-quinasas que são reguladas através da ligação a RAS.

#### EGFR

O receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) está implicado no crescimento celular, na diferenciação, na proliferação, na sobrevivência, na apoptose, e na migração. Verificou-se a sobre-expressão de EGFR em muitos cancros diferentes e mutações de activação do seu domínio quinase parecem ser patogénicas num subconjunto de adenocarcinomas do pulmão.

#### Flt3

A tirosina-quinase semelhante a FMS 3 (FLT3) é uma tirosina-quinase receptora, envolvida em proliferação celular, diferenciação e apoptose. A activação de Flt3 conduz também à activação de fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e cascatas de transdução de sinal de RAS.

### c-Met

c-Met é uma tirosina-cinase receptora que se liga ao factor de crescimento de hepatócitos (HGF) e regula tanto a motilidade celular como o crescimento celular. c-Met é sobre-expressa em tumores, incluindo cancro da tiróide, do estômago, pancreático e do cólon. HGF é também detectado em torno dos tumores, incluindo metástases do fígado. Isto sugere que c-met e HGF têm um papel importante na invasão e metástase.

### Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk6

Cdk1, Cdk2, Cdk4, e Cdk6 conduzem o ciclo celular. A actividade das CDK é regulada através da sua ligação a subunidades específicas tais como ciclinas, factores inibidores e de montagem. A especificidade do substrato e a cronologia das actividades de CDK é ditada pela sua interacção com ciclinas específicas. Cdk4/ciclina D e Cdk6/ciclina D são activas na fase G1, Cdk2/ciclina E e Cdk2/ciclina A na fase S, e Cdk2/ciclina A e a Cdk2/ciclina B na fase G2/M.

A cinase dependente de ciclina tipo 4 (CDK4) tem um papel chave na permissão das células para atravessar a transição da fase G1 para S do ciclo celular e está constitutivamente activada em muitos cancros humanos. O activador de CDK4, ciclina D1, é sobre-expressa e um inibidor de CDK4, p16, está suprimido numa variedade de tumores humanos.

Foram desenvolvidos inibidores de Cdk1/Cdk2 que bloqueiam de forma reversível células normais na fase G1/S ou na



fronteira G2/M. A paragem em G2/M é geralmente menos bem tolerada pelas células e, conseqüentemente, estas sofrem morte celular apoptótica. Uma vez que também se sabe que Hsp90 afecta vias de sobrevivência celular, este efeito pode ser ainda amplificado com um inibidor de Hsp90.

### Wee-1

A proteína-quinase Wee-1 transporta a fosforilação inibidora de CDC2 na tirosina 15 (Tyr15). Isto é necessário para activação do ponto de verificação da fase G2 em resposta a danos no ADN.

Factores de transcrição de Hsp90 implicados na proliferação e sobrevivência celulares incluem os seguintes:

### p53 mutante

P53 é uma proteína supressora tumoral que causa paragem do ciclo celular e induz apoptose. P53 está mutada em aproximadamente metade de todos os cancros. A p53 mutante associa-se a Hsp90 e é sub-regulada em linhas de cancro tratadas com inibidores de Hsp90, enquanto que os níveis de p53 de tipo selvagem eram foram afectados.

### Receptor de estrogénio/Receptor de androgénio

Aproximadamente 70% das mulheres em pós-menopausa que desenvolvem cancro da mama têm tumores que expressam o receptor de estrogénio. O tratamento de primeira linha destas pacientes é dirigido ao impedimento da sinalização através desta via e assim à inibição do crescimento tumoral. Isto pode ser feito através de ablação dos

ovários, tratamento com agonistas da hormona de libertação da gonadotrofina, inibição da aromatase ou tratamento com agonistas específicos que se ligam ao receptor de estrogénio mas impedem mais sinalização. Finalmente, as pacientes desenvolvem resistência a estas intervenções frequentemente em consequência de interacção entre o receptor de estrogénio e receptores de factores de crescimento localizados na membrana celular. Os receptores de estrogénio no estado não ligado estão complexados com Hsp90 que facilita a ligação da hormona. Após ligação ao complexo maduro receptor-Hsp90, o receptor ligado pode ligar-se a elementos de resposta à hormona (HRE) dentro das regiões reguladoras dos genes alvo envolvidos na manutenção da proliferação celular. A inibição de Hsp90 inicia a degradação proteossómica do receptor de estrogénio impedido assim mais sinalização através desta via. Os cancros da próstata são malignidades dependentes de hormonas que respondem a intervenções terapêuticas que reduzem os níveis de testosterona em circulação ou impedem a ligação da testosterona ao receptor de androgénio. Embora os pacientes respondam inicialmente a estes tratamentos, muito posteriormente desenvolvem resistência através do restauro da via de sinalização do receptor de androgénio. Antes da ligação do ligando, o receptor de androgénio existe num complexo com Hsp90 e outras co-chaperonas incluindo p23 e imunofilinas. Esta interacção mantém o receptor de androgénio numa conformação de ligação ao ligando de elevada afinidade. A inibição de Hsp90 leva à degradação proteossómica do receptor de androgénio e outras co-chaperonas que podem sensibilizar o tumor para outras terapias hormonais.

É provável que receptores de hormonas esteróides mutados que tenham surgido por exemplo durante terapia anti-hormonal e que possam ser resistentes a tais terapias, tenham uma maior dependência de Hsp90 quanto à sua estabilidade e função de ligação à hormona.

### Hif-1a

O factor indutível por hipoxia-1a (HIF-1a) é um factor de transcrição que controla a expressão de genes que têm um papel em angiogénese. HIF-1a é expresso na maioria das metástases e sabe-se que se associa a Hsp90. O tratamento com ansamicina de linhas celulares de carcinoma renal leva à ubiquitinação e degradação proteossómica de HIF-1a.

Os inibidores de Hsp90 são capazes de afectar um grande número de alvos significativos para transdução de sinal em proliferação de células tumorais. Inibidores da transdução de sinal que regulam as actividades de um único alvo, podem não ser tão eficazes devido à redundância das vias de sinalização e ao rápido desenvolvimento de resistência.

Através da regulação de múltiplos alvos envolvidos em sinalização celular e proliferação celular, os inibidores de Hsp90 podem provar ser benéficos no tratamento de um amplo espectro de distúrbios proliferativos.

### ZAP70

ZAP-70, um membro da família das proteínas tirosina-cinases Syk-ZAP-70, é normalmente expressa em células T e células assassinas naturais e tem um papel crítico na iniciação de sinalização de células T. No entanto, é também expresso de

forma aberrante em aproximadamente 50% dos casos de CLL, normalmente naqueles casos com genes de receptores de células B não mutados. O estado mutacional dos genes da região variável da cadeia pesada da imunoglobulina ( $IgV_H$ ) nas células leucémicas de leucemia linfocítica crônica (CLL) é um importante factor de prognóstico. A expressão de ZAP-70 em células CLL correlaciona-se com o estado mutacional de  $IgV_H$ , a progressão da doença, e a sobrevivência. CLL positiva para ZAP-70 é mais agressiva que CLL negativa para ZAP-70 indicando que ZAP-70 pode ser um condutor chave de malignidade nesta doença. ZAP-70 está fisicamente associada a Hsp90 em linfoblastos B-CLL, assim a inibição de Hsp90 pode sensibilizar estas células a quimioterapia existente ou a terapia de anticorpos monoclonais.

#### Inibidores de Hsp90 como agentes antifúngicos, antiprotozoários e antiparasitários

As infecções fúngicas tornaram-se uma causa principal de preocupação nos últimos anos devido à utilização disseminada de terapias imunossupressoras e à incidência crescente de espécies que são resistentes a agentes antifúngicos estabelecidos tais como os azoles. A população crescente de pacientes imunocomprometidos (p. ex. pacientes tais como pacientes de transplantes de órgãos, pacientes de cancro submetidos a quimioterapia, pacientes queimados, pacientes de SIDA, ou pacientes com cetoacidose diabética) deu origem a um aumento na incidência de infecções fúngicas oportunistas através de agentes fúngicos tais como espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Aspergillus* e, ocasionalmente, espécies de *Fusarium*, *Trichosporon* e *Dreschlera*.

Consequentemente, existe a necessidade de novos agentes antifúngicos que possam ser utilizados para tratar o número crescente de pacientes com infecções fúngicas e em particular infecções devidas a fungos que se tenham tornado resistentes aos fármacos antifúngicos existentes.

A Hsp90 é conservada ao longo da evolução sendo verificada em bactérias (p. ex. HTPG em *E. coli*) e leveduras (p. ex. HSC82 e HSP82). Embora não tenham sido formalmente identificados clientes para a forma de *E. coli*, em leveduras e todos os organismos superiores, foi mostrado que a família de Hsp90 funciona como uma chaperona para muitas proteínas essenciais tal como descrito acima.

A infecção por uma variedade de patogénios está associada a uma resposta de anticorpos a Hsp90. Por exemplo, em pacientes infectados com *Candida albicans* o fragmento C-terminal de 47 kDa de Hsp90 é um epitopo imunodominante. Além disso, esta resposta de anticorpos está associada a um bom prognóstico sugerindo um efeito protector contra a infecção. Anticorpos recombinantes para um epitopo neste polipéptido são também protectores contra infecção em modelos de ratinho de candidíase invasiva. (Ver Mathews et al., *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2003 vol 47, 2208-2216 e referências aí contidas). De igual modo, Hsp90 expressa à superfície serve como antigénio na doença de Chagas, acariase, leishmaniose, toxoplasmose e infecção devida a *Schistosoma mansoni* e foi postulado que os anticorpos para Hsp90 conferem protecção contra infecção de plasmódio e Malária.

Mycograb (NeuTec Pharma/Novartis) é um anticorpo monoclonal recombinante humano contra a proteína de choque térmico 90

que está a ser desenvolvido como tratamento para *Candida* e tem mostrado respostas significativas em ensaios iniciais. Além disso, os produtos naturais inibidores de Hsp90 Geldanamicina, Herbimicina e Radicicol foram originalmente identificados pela sua actividade antifúngica. Proteínas essenciais chave foram identificadas como clientes de Hsp90 em vários patógenos humanos (ver Cowen e Lindquist, *Science*. 30 Set. 2005; 309(5744): 2175-6). Assim, Hsp90 pode ter um papel importante no crescimento de patógenos tais como espécies de *Candida*, e os inibidores de Hsp90 podem ser úteis como tratamentos para uma variedade de doenças infecciosas incluindo candidíase.

Verificou-se também que Hsp90 aumenta a capacidade dos fungos para desenvolver resistência a fármacos antifúngicos (ver Cowen, LE, Lindquist, S. "Hsp90 potentiates the rapid evolution of new traits: drug resistance in diverse fungi". *Science*. 30 Set. 2005;309 (5744): 2185-9). Portanto, a co-administração de um inibidor de Hsp90 com um fármaco antifúngico pode aumentar a eficácia do fármaco antifúngico e reduzir a resistência através da prevenção da emergência de fenótipos resistentes.

#### Inibidores de Hsp90 no tratamento de dor, condições neuropáticas e acidente vascular cerebral

Cdk5 é um membro da família Cdk de serina/treonina-cinases, a maioria dos quais são reguladores chave do ciclo celular. A actividade de Cdk5 é regulada através da associação com os seus activadores específicos dos neurónios, p35 e p39. Provas recentes sugerem que CDK5 pode fosforilar a proteína tau e várias outras proteínas neuronais tais como NUDE-1, sinapsina1, DARPP32 e o complexo Munc18/Syntaxina1A. A

evidência também sugere que a actividade aberrante de Cdk5 induzida através da conversão de p35 em p25 tem um papel na patogénese de doenças neurodegenerativas tais como doença de Alzheimer (DA), esclerose lateral amiotrófica (ELA) e doença de Niemann-Pick tipo C (NPD). A hiperfosforilação anormal de tau após tratamento de A $\beta$ <sub>1-42</sub> desestabiliza os microtúbulos, contribuindo para a degeneração das neurites e a formação de filamentos helicoidais emparelhados (PHF) contendo feixes neurofibrilhares (NFT), uma das principais lesões da DA. Verificou-se ainda que cdk5 é necessária para corrigir o desenvolvimento neuronal.

A proteína p35 que actua como um regulador da actividade de CDK5 foi recentemente identificada como uma proteína cliente para Hsp90 e portanto a actividade de CDK5 pode ser regulada através de alterações no nível e na actividade de Hsp90. Assim, a inibição de Hsp90 pode conduzir a perda de p35, uma inibição de CDK5, uma redução da proteína tau fosforilada em indivíduos susceptíveis e pode trazer benefício aos que sofrem de Doença de Alzheimer.

Mostrou-se que a inibição adicional de Hsp90 utilizando agentes conhecidos reduz a acumulação de agregados de proteína tau em sistemas celulares *in vitro*. (Dickey *et al.*, *Curr. Alzheimer Res.* 2 Abr. 2005; 2(2): 231-8).

Mostrou-se também que Cdk5 tem um papel na mediação da sinalização de dor. Mostrou-se que tanto Cdk5 como p35 são expressas em neurónios nociceptivos. Em ratinhos *knockout* para p35, que mostram actividade de Cdk5 substancialmente reduzida, a resposta a estímulos térmicos dolorosos é retardada (Pareek, T.K., *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103: 791-796 (2006).

Adicionalmente, mostrou-se que a administração do inibidor da cinase dependente de ciclina 5 (Cdk5), roscovitina, atenua respostas nociceptivas induzidas por formalina em ratos (Wang, Cheng-haung, et al., *Acta Pharmacologica Sinica.*, 26: 46-50 (2005)). A activação de calpaína é dependente de cálcio e sabe-se que é afectada pela activação do canal de cálcio do receptor de NMDA (Amadoro, G; *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103, 2892-2897 (2006)). Sabe-se que os antagonistas do receptor de NMDA são clinicamente eficazes contra condições de dor neuropática (Christoph, T; et al., *Neuropharmacology*, 51. 12-17 (2006)). Esta eficácia pode estar ligada ao efeito do influxo de cálcio relacionado com o receptor de NMDA na actividade de calpaína e ao seu subsequente efeito na actividade de Cdk5. Como tal, espera-se que tais compostos moduladores da actividade de Cdk5 sejam úteis para o tratamento ou a prevenção de dor e assim a modulação do regulador de CDK5, p35, através da inibição de Hsp90 poderá levar à inibição de CDK5.

É desejável ter um agente para o tratamento paliativo de dor, i.e. o alívio directo de dor para além do alívio de dor em resultado da melhoria da doença ou condição médica subjacente, que é a causa da dor.

Mostrou-se que várias Cdk (especialmente as Cdk 4, 5 e 6) estão envolvidas com, ou medeiam a morte neuronal após insulto hipóxico ou isquémico (Rashidan, J., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102: 14080-14085 (2005)). Além disso, mostrou-se que o inibidor de Cdk, flavopiridol, reduz significativamente a morte neuronal num modelo de rato de isquemia cerebral focal



(Osuga, H., et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, 97: 10254-10259 (2000)). Mostrou-se que inibidores de Cdk5 têm efeitos protectores em ambos os paradigmas necrótico como apoptótico da morte celular neuronal (Weishaupt, J., et al., *Molecular and Cellular Neuroscience*, 24: 489-502 (2003)).

O acidente vascular cerebral é um evento cerebrovascular, que ocorre quando o fluxo sanguíneo normal para o cérebro é perturbado, e o cérebro recebe demasiado ou insuficiente sangue. O acidente vascular cerebral é uma das principais causas de morte no mundo, e é também uma das causas mais comuns de incapacidade neurológica.

O acidente vascular cerebral isquémico, que é o tipo mais comum de acidente vascular cerebral, resulta de insuficiente circulação cerebral de sangue causada por obstrução do influxo de sangue arterial. Normalmente, o fornecimento de sangue cerebral adequado é assegurado por um sistema de artérias dentro do cérebro. No entanto, vários distúrbios, incluindo inflamação e aterosclerose, podem causar um trombo, i.e., um coágulo sanguíneo que se forma num vaso sanguíneo. O trombo pode interromper o fluxo de sangue arterial, causando isquemia cerebral e consequentes sintomas neurológicos. O acidente vascular cerebral isquémico pode também ser causado pelo alojamento de um êmbolo (uma bolha de ar) a partir do coração num vaso intracraniano, causando menor pressão de perfusão ou maior viscosidade do sangue com fluxo de sangue cerebral inadequado. Um êmbolo pode ser causado por vários distúrbios, incluindo fibrilhação auricular e aterosclerose.

Um segundo tipo de acidente vascular cerebral, acidente vascular cerebral hemorrágico, envolve uma hemorragia ou ruptura de uma artéria conduzindo ao cérebro. O acidente vascular cerebral hemorrágico resulta em sangramento no tecido cerebral, incluindo o espaço epidural, subdural, ou subaracnóide do cérebro. Um acidente vascular cerebral hemorrágico resulta tipicamente da ruptura de um vaso arteriosclerótico que foi exposto a hipertensão arterial ou a trombose.

Uma oportunidade para intervenção em acidente vascular cerebral é a prevenção ou redução do risco de acidente vascular cerebral em pacientes em risco de acidente vascular cerebral. Existem muitos factores de risco para acidente vascular cerebral, incluindo inflamação vascular, aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes, hiperlipidemia e fibrilhação auricular. Pacientes em risco foram tratados com agentes para controlar a pressão sanguínea ou gerir o nível de lípidos no sangue, e têm sido tratados com agentes antiplaquetas (tais como clopidrogel) e anticoagulantes. Uma segunda oportunidade é o tratamento de acidente vascular cerebral agudo. No entanto, as terapias farmacológicas actuais para tratamento de acidente vascular cerebral agudo estão limitadas ao restauro do fluxo sanguíneo dentro de uma janela de tempo terapêutica estreita de menos de três horas após o acidente vascular cerebral. Permanece a necessidade de agentes que sejam eficazes dentro de uma janela de tempo terapêutica maior. Outra oportunidade é a recuperação ou o restauro após o período agudo do acidente vascular cerebral, i.e. a redução ou prevenção de lesão celular secundária na penumbra. Permanece a necessidade de agentes que sejam eficazes na

redução ou prevenção de lesão celular secundária após acidente vascular cerebral.

Seria desejável obter um único agente farmacêutico que possa ser utilizado em mais de uma das oportunidades acima mencionadas para tratamento de acidente vascular cerebral. Um tal agente pode ser administrado a pacientes em risco de acidente vascular cerebral, e pode também ser administrado a pacientes sofrendo de acidente vascular cerebral agudo, ou pacientes submetidos a tratamento para recuperação ou restauro após o período agudo do acidente vascular cerebral. Um tal agente pode também ser alvo de mais de um mecanismo distinto na cascata bioquímica do acidente vascular cerebral.

#### Inibidores de Hsp90 e o tratamento de Hepatite C e outras doenças virais

A infecção de uma célula hospedeira com ARN/ADN viral resulta num substancial redireccionamento da síntese proteica celular para proteínas virais chave codificadas pelo ácido nucleico viral. O maior fardo da síntese de proteínas coloca um stresse à célula em consequência de maior procura de energia e precursores sintéticos. A sobre-regulação de proteínas de choque térmico é frequentemente uma consequência da infecção viral pelo menos em parte devido a estes stresse. Uma função da indução de HSP pode ser o auxílio na estabilização e dobragem de elevados níveis de proteína "estranha" gerada na preparação da replicação viral. Em particular, trabalho recente sugeriu que a Hsp90 é necessária para a produção estável da protease NS2/3 funcional em células infectadas com o replicão de Hepatite C (HCV). Demonstrou-se também que

inibidores de Hsp90 bloqueiam a replicação viral em sistemas *in vitro*. (Nagkagawa, S., Umehara T., Matsuda C., *et al.*, *Biochem. Biophys. Res Commun.* 353 (2007) 882-888; Waxman, L., Witney, M. *et al.*, *PNAS* 98 (2001): 13931 - 13935)).

### Proteínas de Choque Térmico e resistência a fármacos anti-tumorais

É há muito reconhecido que a conformação terciária nativa de qualquer dado polipéptido é determinada pela sua sequência primária (de aminoácidos). No entanto, tal como explicado acima, é agora claro que a dobragem correcta de muitas proteínas *in vivo* requer o auxílio de proteínas de choque térmico (Hsp) actuando como acompanhantes moleculares (chaperonas). Embora esta função de acompanhante seja importante para a função celular normal sob todas as condições, torna-se crucial em células que estejam stressadas (por exemplo por calor, hipóxia ou acidose).

Tais condições prevalecem tipicamente em células tumorais, que existem num ambiente hostil do hospedeiro. É portanto provável que a sobre-regulação das Hsp frequentemente observada em tais células represente um mecanismo através do qual as células malignas mantêm a integridade dos seus proteomas sob condições que comprometem a dobragem das proteínas. Assim, moduladores ou inibidores de proteínas de stresse em geral (e Hsp90 em particular) representam uma classe de quimioterapêuticos com a capacidade única de inibir múltiplas vias de sinalização aberrantes simultaneamente. Estes podem portanto exercer efeitos anti-tumorais ao mesmo tempo que eliminam (ou reduzem a

incidência de) a resistência relativamente a outros paradigmas de tratamento.

Além disso, intervenções terapêuticas anticâncer de todos os tipos aumentam necessariamente os stresses impostos às células tumorais alvo. Na mitigação dos efeitos deletérios de tais stresses, as Hsp estão directamente implicadas em resistência aos efeitos de fármacos de câncer e regimes de tratamento. Assim, moduladores ou inibidores da função das proteínas de stress em geral (e Hsp90 em particular) representam uma classe que quimioterapêuticos com o potencial de: (i) sensibilizar células malignas a fármacos e/ou tratamentos anticâncer; (ii) alívio ou redução da incidência da resistência a fármacos e/ou tratamentos anticâncer; (iii) reversão de resistência a fármacos e/ou tratamentos anticâncer; (iv) potenciação da actividade de fármacos e/ou tratamentos anticâncer; (v) atraso ou prevenção do surgimento de resistência a fármacos e/ou tratamentos anticâncer.

#### Pró-fármacos

Os pró-fármacos são geralmente reconhecidos como sendo compostos químicos que têm pouca ou nenhuma actividade farmacológica em si mesmos mas que sofrem biotransformação num metabolito terapeuticamente activo *in vivo* (ver por exemplo Bernard Testa, *Biochemical Pharmacology*, 68 (2004), 2097-2106, e "Design of Prodrugs" (Bundgaard, H. ed.) 1985 Elsevier Science Publishers B. V. (Biomedical Division) e Rautio *et al.*, *Nature Reviews (Drug Discovery)*, Volume 7, Março 2008, 255 a 270).

Os pró-fármacos são utilizados por uma variedade de razões. Por exemplo, podem ser utilizados *inter alia* para:

- conferir melhor solubilidade a um fármaco de outro modo insolúvel ou fracamente solúvel
- melhorar a estabilidade química
- melhorar as propriedades organolépticas de um fármaco
- alterar a farmacocinética de um fármaco
- reduzir o metabolismo pré-sistémico (primeiro passo)
- reduzir a extensão da conjugação de um fármaco
- melhorar a absorção oral
- proporcionar o direccionamento selectivo de um fármaco
- proporcionar a activação *in situ* de um agente citotóxico

Enquanto tanto como 5-7% dos fármacos aprovados em todo o mundo podem ser classificados como pró-fármacos (Rautio (2008)), provou-se que o desenvolvimento de pró-fármacos de fármacos contendo grupos hidroxilo fenólicos é de algum modo problemático.

Foram propostos e/ou investigados vários derivados de grupos hidroxilo (ver Rautio *idem*) mas com resultados variáveis.

No caso do pró-fármaco terbutalina (bambuterol), os dois grupos hidroxilo fenólicos de terbutalina foram derivados para dar grupos dimetilcarbamoiloxilo que são lentamente convertidos novamente nos grupos hidroxilo *in vivo* para regenerar a terbutalina.

No entanto, noutros locais na literatura, verificou-se que muitos derivados dialquilcarbamato simples de compostos hidroxilo são demasiado estáveis e demasiado resistentes à hidrólise para funcionar como pró-fármacos (Igarashi et

*al.*, *Chem. Pharm. Bull.*, 55(2): 328-333 (2007) - ver em particular a página 329, coluna 2).

Pró-fármacos dialquilcarbamato simples foram também associados a efeitos secundários tóxicos (Thorberg *et al.*, *J. Med. Chem.*, 1987, 30, No. 11, 2008-2012 - ver em particular a página 2010, coluna 2). Thorberg *et al.* verificaram que os derivados arilcarbamato não davam origem aos mesmos efeitos tóxicos.

Derivados monoalquilcarbamato de compostos hidroxilo fenólicos foram também investigados como potenciais pró-fármacos. Igarashi *et al.* (*idem*) verificaram que o derivado monoetilcarbamoilo de um análogo fenólico de capilarisina deu bons níveis plasmáticos do composto fenólico original mas que outros carbamatos monossubstituídos eram hidrolisados ou metabolizados demasiadamente prontamente para serem adequados como pró-fármacos. Além disso, como os dialquilcarbamatos, os monoalquilcarbamatos foram também associados a efeitos secundários tóxicos (Thorberg *et al.*, *idem* página 2010, coluna 2).

Os derivados éster e éter do agonista auto-receptor da dopamina fenólica (-)-3-(hidroxifenil)-*N*-propil-piperidina foram também investigados por Thorberg *et al.* como potenciais pró-fármacos mas verificaram (ver página 2010, coluna 1) que os derivados éter e éster acílico não conseguiram gerar o composto original no plasma, possivelmente por causa de uma falta de estabilidade e uma tendência para hidrolisar enquanto no tracto digestivo.

Assim, tal como indicado acima, o desenvolvimento de pró-fármacos para compostos fenólicos está longe de ser simples

e derivados do grupo funcional que podem proporcionar propriedades de pró-fármaco úteis numa classe de compostos podem ser ineficazes ou podem mesmo dar origem a problemas de toxicidade noutras classes de compostos.

WO 99/29705 (Glycomed et al.) divulga uma classe de compostos glicomiméticos possuindo várias utilizações possíveis incluindo o tratamento de cancro. Um composto especificamente divulgado em WO 99/29705 é o composto ácido 2-(2-hidroxi-benzoil)-1,2,3,4-tetra-hidro-isoquinolina-3-carboxílico.

WO 2006/117669 (Pfizer) divulga uma classe de resorcinóis de amida como inibidores de Hsp90.

O pedido internacional WO2006/109085 (Astex Therapeutics) divulga amidas de ácido hidroxibenzóico como inibidores de Hsp90.

WO 2008/044027 (Astex Therapeutics) divulga pró-fármacos dos compostos de WO2006/109085.

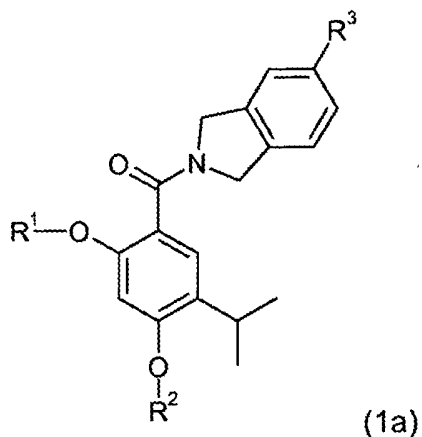
### **Sumário da Invenção**

A presente invenção proporciona um novo grupo de compostos pró-fármacos contendo grupos funcionais que são modificados ou removidos *in vivo* para dar compostos possuindo actividade de inibição ou modulação de Hsp90. Espera-se que os compostos pró-fármacos sejam úteis em prevenção ou tratamento de estados de doença ou condições mediadas por Hsp90.



Assim, por exemplo, considera-se que os compostos da invenção são úteis em alívio ou redução da incidência de cancro.

Deste modo, num primeiro aspecto (Aspecto I), a invenção proporciona um composto da fórmula (1 a):



ou um sal, solvato, N-óxido ou tautómero deste;

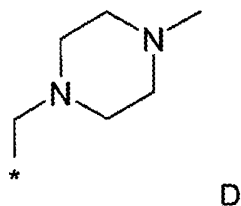
em que ou  $R^1$  é  $R^{1a}$  e  $R^2$  é  $R^{2a}$ ; ou  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$ ; desde que em cada caso pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  seja diferente de hidrogénio;

$R^{1a}$  e  $R^{2a}$  são iguais ou diferentes e cada um é seleccionado a partir de hidrogénio, alquilo  $C_{1-4}$ , alcenilo  $C_{2-4}$  e alcinilo  $C_{2-4}$  em que o alquilo  $C_{1-4}$  é substituído por alcoxilo  $C_{1-2}$ ;

$R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio,  $C(O)NR^4R^5$ ,

$C(O)R^6$  e  $C(O)OR^6$  em que  $R^6$  é alquilo  $C_{1-4}$ ,  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ , ou  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros contendo opcionalmente um segundo membro de anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  e/ou um ou dois grupos oxo; e

$R^3$  é um grupo D:



em que o asterisco denota o ponto de ligação ao anel isoindolina;

mas excluindo o composto éster 5-acetoxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-il)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido acético.

Na fórmula (1a), ou  $R^1$  é  $R^{1a}$  e  $R^2$  é  $R^{2a}$ ; ou  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$ ; desde que em cada caso pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  seja diferente de hidrogénio.

Numa forma de realização geral (Forma de Realização AA),  $R^1$  é  $R^{1a}$  e  $R^2$  é  $R^{2a}$ .

Dentro da Forma de Realização AA, num grupo de compostos (Grupo AAA),  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  podem ser o mesmo ou diferentes e cada um pode ser seleccionado a partir de hidrogénio, alquilo  $C_{1-2}$  (p. ex. metilo), alcenilo  $C_{2-3}$  (p. ex. alilo) e alcinilo  $C_{2-3}$  (p. ex. propargilo) em que o alquilo  $C_{1-2}$  é substituído por metoxilo.

Por exemplo, num Grupo AAAA de compostos dentro do Grupo AAA,  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  podem, cada um, ser seleccionados a partir de hidrogénio, metilo, metoximetilo e alilo.

Noutro subgrupo particular (AAAAB) de compostos dentro Grupo AAAA,  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  são, cada um, seleccionados a partir de hidrogénio e metoximetilo.

Noutro subgrupo particular (AAAAC) de compostos dentro do Grupo AAAA,  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  são, cada um, seleccionados a partir de hidrogénio e alilo.

Noutra forma de realização geral (Forma de Realização AB),  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$ .

Dentro da Forma de Realização AB, num subgrupo de compostos (Grupo ABA),  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio,  $C(O)NR^4R^5$ ,  $C(O)R^6$  e  $C(O)OR^6$  em que  $R^6$  é alquilo  $C_{1-4}$ ,  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ .

Dentro do Grupo ABA, num subgrupo de compostos (Grupo ABAA),  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio e  $C(O)NR^4R^5$ . Dentro do Grupo ABAA, mais particularmente,  $R^4$  e  $R^5$  podem ambos ser alquilo  $C_{1-3}$ . Por exemplo,  $R^4$  e  $R^5$  podem ambos ser seleccionados a partir de metilo e etilo. Numa forma de realização,  $R^{1a}$  é hidrogénio e  $R^{1b}$  é  $C(O)NR^4R^5$ . Noutra forma de realização,  $R^{1b}$  é hidrogénio e  $R^{1a}$  é  $C(O)NR^4R^5$ .

Noutro subgrupo de compostos (Grupo ABAB) dentro do Grupo ABA,  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio e  $C(O)R^6$ . Dentro do Grupo ABAB,  $R^6$  pode ser metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo ou terc-butilo. Numa forma de realização preferida (Grupo ABABA),  $R^6$  é alquilo  $C_{2-4}$  (de maior preferência alquilo  $C_{3-4}$  tal como terc-butilo ou isopropilo).

Noutro subgrupo de compostos (Grupo ABAC) dentro do Grupo ABA,  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados

a partir de hidrogénio e  $C(O)OR^6$ . Dentro do Grupo ABAC,  $R^6$  pode ser metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo ou *terc*-butilo. Numa forma de realização preferida (Grupo ABACA),  $R^6$  é alquilo  $C_{2-4}$  (de preferência alquilo  $C_{3-4}$  tal como *terc*-butilo ou isopropilo).

Noutro subgrupo de compostos (Grupo ABAD), um de  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  é  $C(O)NR^4R^5$  em que  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ , e o outro de  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  é seleccionado a partir de  $C(O)R^6$  e  $C(O)OR^6$  em que  $R^6$  é tal como definido em qualquer um dos Grupos ABAB, ABABA, ABAC e ABACA.

Noutro subgrupo de compostos (Grupo ABB) dentro da Forma de Realização AB,  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e cada um é hidrogénio ou um grupo  $C(O)NR^4R^5$ , em que  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros contendo opcionalmente um segundo membro de anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  (p. ex. grupos metilo) e/ou um ou dois grupos oxo.

Por exemplo, dentro do Grupo ABB, num subconjunto de compostos (Grupo ABBA), o anel heterocíclico saturado é seleccionado a partir de azetidina, pirrolidina, pirrolidona, piperidina, piperidona, azepina, piperazina, 4-metilpiperazina, morfolina e tiomorfolina.

Noutro subconjunto de compostos (Grupo ABBB) dentro do Grupo ABB,  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado com 5 ou 6 membros contendo opcionalmente um segundo membro de anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e

formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  (p. ex. grupos metilo) e/ou um ou dois grupos oxo. Dentro do Grupo ABBB, um subconjunto preferido (Grupo ABBBA) de anéis heterocíclicos saturados consiste em pirrolidina, piperidina, piperazina, 4-metilpiperazina e morfolina. Numa forma de realização preferida dentro do Grupo ABBBA, o anel heterocíclico saturado é pirrolidina. Noutra forma de realização preferida dentro do Grupo ABBBA, o anel heterocíclico saturado é morfolina.

No Aspecto I e nas Formas de Realização Gerais AA e AB e subgrupos e subconjuntos destas, tal como definido, acima, pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  tem de ser diferente de hidrogénio.

Num subgrupo de compostos dentro de cada um de Aspecto I e as Formas de Realização Gerais AA e AB e subgrupos e subconjuntos destas tal como definido, acima, um de  $R^1$  e  $R^2$  é diferente de hidrogénio e o outro é hidrogénio. Numa forma de realização geral,  $R^2$  é diferente de hidrogénio.

Noutro subgrupo de compostos dentro cada um de Aspecto I e as Formas de Realização Gerais AA e AB e subgrupos e subconjuntos destas tal como definido, acima,  $R^1$  e  $R^2$  são ambos diferentes de hidrogénio.

Noutros aspectos da invenção (Aspectos (II) e (III) tal como aqui definido, são proporcionados compostos das fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) tal como definido nas reivindicações anexas.

Em cada um de Aspecto (II) e Aspecto (III) tal como definido acima,  $n$  é de preferência 1 ou 2. Numa forma de realização geral (Forma de Realização BA) dentro de cada um de Aspecto (II) e Aspecto (III),  $n$  é 1.

Em cada um dos Aspectos (II) e (III), Forma de Realização BA e Grupos BAA, BAB e BAC,  $R^1$  e  $R^2$  podem ser tal como definidos em qualquer uma das Formas de Realização AA e AB, e Grupos AAA, AAAA, AAAAB, AAAAC, ABA, ABAA, ABAB, ABABA, ABAC, ABACA, ABB, ABBA, ABBB, ABBBA e ABAD tal como aqui anteriormente definido e as preferências dentro de cada um dos referidos Grupos.

No Aspecto (V) e na Forma de realização BA e Grupos BAA, BAB e BAC desta,  $R^{1a}$  e  $R^{1b}$  podem ser tal como definido em qualquer uma de Formas de Realização AA e AB, e Grupos AAA, AAAA, AAAAB, AAAAC, ABA, ABAA, ABAB, ABABA, ABAC, ABACA, ABB, ABBA, ABBB, ABBBA e ABAD como aqui anteriormente definido e as preferências dentro de cada um dos referidos Grupos; e o anel heterocíclico saturado da porção  $R^{1c}$  pode ser tal como definido em qualquer um dos Grupos ABBA, ABBB e ABBBA e as preferências dentro cada um dos referidos Grupos.

Compostos específicos da invenção são:

(2-aliloxi-4-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;  
 (4-aliloxi-2-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;  
 (2,4-bis-aliloxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

[4-hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)-fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

[2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)-fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

[5-isopropil-2,4-bis-(metoximetiloxi)-fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;  
éster 5-dietilcarbamoiloxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico;

éster 5-dimetilcarbamoiloxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;

2-[2,4-bis-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[2,4-bis-(morfolin-4-il-carboniloxi)-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

éster 5-hidroxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetilil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico;

éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico;

éster 5-hidroxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;

éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;

2-[2-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)-4-hidroxi-5-isopropilbenzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[4-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)-2-hidroxi-5-isopropilbenzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[2-(morfolin-4-ilcarboniloxi)-4-hidroxi-5-isopropilbenzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)-2-hidroxi-5-isopropilbenzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

éster 5-dimetilcarbamoiloxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico de éster terc-butílico do ácido carbónico;

éster *terc*-butílico de éster 5-*terc*-butoxicarboniloxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido carbónico;

éster 5-(2,2-dimetil-propioniloxi)-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido 2,2-dimetil-propiónico;

éster 5-isobutiriloxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido isobutírico;

e sais, solvatos, tautómeros e N-óxidos destes.

Um grupo de compostos preferidos da invenção consiste em:

éster 5-hidroxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico; e

éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;



e sais, solvatos, tautómeros e N-óxidos destes.

Dentro do grupo acima referido de compostos preferidos da invenção, um composto particular é:

éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;

e sais, solvatos, tautómeros e N-óxidos destes.

Os compostos das fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) e subgrupos destes, tal como aqui definido, são pró-fármacos dos compostos divulgados no nosso pedido anterior PCT/GB2006/001382. Assim, considera-se que os compostos das fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) serão convertidos *in vivo* para compostos em que R<sup>1</sup> e R<sup>2</sup> são ambos OH.

Em outros aspectos, a invenção proporciona:

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tais como aqui definidos, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado de doença ou uma condição mediada por Hsp90.

- A utilização de um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tais como aqui definidos, para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado de doença ou uma condição mediada por Hsp90.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tais como aqui definidos, para utilização no alívio ou redução da incidência de um estado de doença ou uma condição mediada por Hsp90.

- A utilização de um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos.

- Composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tais como aqui definidos, para utilização no tratamento de uma doença ou condição compreendendo ou surgindo crescimento celular anormal num mamífero.

- A utilização de um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos deste tal como aqui definido para o fabrico de um medicamento para tratamento de uma doença ou condição compreendendo ou surgindo de crescimento celular anormal num mamífero.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos deste tal como aqui definidos, para utilização no alívio ou na redução da incidência de uma doença ou condição compreendendo ou surgindo de crescimento celular anormal num mamífero.

- A utilização de um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tais como aqui definidos, para o fabrico de um medicamento para alívio ou redução da incidência de uma doença ou condição compreendendo ou surgindo de crescimento celular anormal num mamífero.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização como um inibidor de Hsp90.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização em modulação de um processo celular (por exemplo divisão celular) através da inibição da actividade de Hsp90.
- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado de doença tal como aqui descrito.
- A utilização de um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para o fabrico de um medicamento, em que o medicamento é para qualquer uma ou mais das utilizações aqui definidas.
- Um composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos desta tal como aqui definidos, e um transportador farmacêuticamente aceitável.
- Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos desta tal como aqui definidos, e um transportador farmacêuticamente aceitável numa forma adequada para administração oral.
- Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos desta tal como aqui definidos, e um transportador farmacêuticamente aceitável numa forma adequada para

administração parentérica, por exemplo através de administração intravenosa (i.v.).

- Uma composição farmacêutica compreendendo um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, e um transportador farmacêuticamente aceitável numa forma adequada para administração intravenosa (i.v.) através de injeção ou infusão.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização em medicina.

- Um composto, tal como aqui definido, para qualquer uma das utilizações e dos métodos expostos acima, e tal como aqui descritos noutros locais.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização em tratamento ou profilaxia de um estado de doença ou uma condição num paciente que tenha sido rastreado e tenha sido determinado como sofrendo de, ou estando em risco de sofrer de, uma doença ou condição que possa ser susceptível a tratamento com um composto possuindo actividade contra Hsp90.

- A utilização de um composto da fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para o fabrico de um medicamento para o tratamento ou a profilaxia de um estado de doença ou uma condição num paciente que tenha sido rastreado e tenha sido determinado como sofrendo de, ou estando em risco de sofrer de, uma doença ou condição que possa ser susceptível a

tratamento com um composto possuindo actividade contra Hsp90.

#### Preferências Gerais e Definições

Os compostos da invenção são pró-fármacos de inibidores de Hsp90 de amida do ácido hidroxibenzóico divulgados no nosso pedido Internacional anterior PCT/GB2006/001382. Por conveniência, os compostos de PCT/GB2006/001382 podem ser referidos de forma variada neste pedido como "os compostos originais" ou "os compostos fenólicos". Sendo as referências aos pró-fármacos "derivados" dos "compostos originais" ou "compostos fenólicos" apenas para sugerir uma relação estrutural e não se pretende sugerir qualquer método particular de preparação dos pró-fármacos. Assim, os pró-fármacos podem ser preparados a partir dos compostos de PCT/GB2006/001382 tal como descrito abaixo, ou podem ser preparados através de métodos que não envolvam a intermediação de um composto fenólico de PCT/GB2006/001382.

Uma referência a um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) e Formas de Realização, subgrupos deste inclui formas iónicas, sais, solvatos, isómeros, tautómeros e isotopos destes, tal como discutido abaixo.

Os compostos das fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos deste, incluindo formas iónicas, sais, solvatos, isómeros, tautómeros e isotopos destes tal como aqui definidos, podem ser referidos por conveniência como "os compostos da invenção" ou, no singular, "um composto da invenção".

Tal como aqui utilizado, o termo "tratamento" e os termos relacionados "tratar" e "tratando" referem-se tanto ao tratamento profiláctico ou preventivo bem como ao tratamento curativo ou paliativo de dor. Assim, o termo engloba situações em que a dor está já a ser experimentada por um sujeito ou paciente, bem como situações em que a dor não está a ser experimentada, mas espera-se que surja. O termo "tratamento", "tratar", "tratando" e termos relacionados abrangem também a redução completa e parcial ou a prevenção de dor. Assim, por exemplo, os compostos da invenção podem impedir que a dor existente se agrave, ou reduzem ou eliminam mesmo a dor. Quando usados num sentido profiláctico, os compostos podem impedir que qualquer dor se desenvolva ou podem diminuir o grau de dor que se pode desenvolver.

Tal como aqui utilizado, o termo "modulação", tal como aplicado à actividade da proteína de choque térmico Hsp90, pretende definir uma alteração no nível de actividade biológica da proteína de choque térmico. Assim, a modulação engloba alterações fisiológicas que efectuem um aumento ou uma diminuição na actividade da proteína de choque térmico relevante. Neste último caso, a modulação pode ser descrita como "inibição". A modulação pode surgir directa ou indirectamente, e pode ser mediada por qualquer mecanismo e em qualquer nível fisiológico, incluindo, por exemplo, ao nível da expressão génica (incluindo, por exemplo, transcrição, tradução e/ou modificação pós-tradução), ao nível da expressão de genes codificando elementos reguladores que actuem, directa ou indirectamente, sobre os níveis de actividade da proteína de choque térmico. Assim, a modulação pode implicar expressão elevada/reprimida ou sobre ou sub-expressão da proteína de choque térmico,

incluindo amplificação do gene (i.e. múltiplas cópias do gene) e/ou expressão aumentada ou diminuída por um efeito de transcrição, bem como hiperactividade (ou hipoactividade) e activação (desactivação) da proteína de choque térmico (incluindo activação (desactivação) através de mutação (mutações)). Os termos "modulado", "modulação" e "modular" devem ser interpretados deste modo.

Tal como aqui utilizado, o termo "mediado", tal como utilizado p. ex. em conjunto com a proteína de choque térmico tal como aqui descrito (e aplicado por exemplo em vários processos fisiológicos, doenças, estados, condições, terapias, tratamentos ou intervenções) destina-se a funcionar de forma restritiva de modo a que os vários processos, doenças, estados, condições, tratamentos e intervenções aos quais o termo é aplicado são aqueles em que a proteína de choque térmico Hsp90 desempenha um papel biológico. Em casos em que o termo é aplicado a uma doença, estado ou condição, o papel biológico desempenhado pela proteína de choque térmico Hsp90 pode ser directo ou indirecto e pode ser necessário e/ou suficiente para a manifestação dos sintomas da doença, estado ou condição (ou a sua etiologia ou progressão). Assim, a actividade da proteína de choque térmico Hsp90 (e em particular os níveis aberrantes de actividade da proteína de choque térmico Hsp90, p. ex. sobre-expressão de Hsp90) não precisam de ser necessariamente a causa próxima da doença, estado ou condição: em vez disso, está contemplado que as doenças, estados ou condições mediadas pela proteína de choque térmico Hsp90 incluem aquelas possuindo etiologias multifactoriais e progressões complexas em que Hsp90 está apenas parcialmente envolvida. Em casos em que o termo é aplicado a tratamento, profilaxia ou intervenção (p. ex.

nos "tratamentos mediados por Hsp90" e "profilaxia mediada por Hsp90" da invenção), o papel desempenhado por Hsp90 pode ser directo ou indirecto e pode ser necessário e/ou suficiente para a operação do tratamento, profilaxia ou resultado da intervenção. Assim, um estado ou condição de doença mediado por Hsp90 inclui o desenvolvimento de resistência a qualquer fármaco ou tratamento de cancro particular (incluindo em particular resistência a um ou mais dos inibidores de sinalização aqui descritos).

O termo "intervenção" é um termo da técnica aqui utilizado para definir qualquer agência que realize uma alteração fisiológica a qualquer nível. Assim, a intervenção pode compreender a indução ou repressão de qualquer processo fisiológico, evento, via bioquímica ou evento celular/bioquímico. As intervenções da invenção realizam tipicamente (ou contribuem para) a terapia, o tratamento ou a profilaxia de uma doença ou condição.

Tal como aqui utilizado, o termo "combinação", tal como aplicado a dois ou mais compostos e/ou agentes (também aqui referidos como *componentes*), destina-se a definir o material no qual os dois ou mais compostos/agentes estão associados. Os termos "combinado" e "combinação" neste contexto devem ser interpretados em conformidade.

A associação dos dois ou mais compostos/agentes numa combinação pode ser física ou não física. Exemplos de compostos/agentes fisicamente associados combinados incluem:

- composições (p. ex. formulações unitárias) compreendendo os dois ou mais compostos/agentes em mistura (por exemplo dentro da mesma dose unitária);



- composições compreendendo material em que os dois ou mais compostos/agentes são ligados quimicamente/físico-quimicamente (por exemplo através de ligação cruzada, aglomeração molecular ou ligação a uma porção comum do veículo);
- composições compreendendo material em que os dois ou mais compostos/agentes são quimicamente/físico-quimicamente co-empacotados (por exemplo, dispostos sobre ou dentro de vesículas lipídicas, partículas (p. ex., micro ou nanopartículas) ou gotículas de emulsão);
- estojos farmacêuticos, embalagens farmacêuticas ou embalagens do paciente em que os dois ou mais compostos/agentes são co-empacotados ou co-apresentados (p. ex. como parte de uma série de doses unitárias).

Exemplos de compostos/agentes combinados associados não fisicamente incluem:

- material (p. ex., uma formulação não unitária) compreendendo pelo menos um dos dois ou mais compostos/agentes em conjunto com instruções para a associação extemporânea de pelo menos um composto para formar uma associação física dos dois ou mais compostos/agentes;
- material (p. ex. uma formulação não unitária) compreendendo pelo menos um dos dois ou mais compostos/agentes em conjunto com instruções para terapia de combinação com os dois ou mais compostos/agentes;
- material compreendendo pelo menos um dos dois ou mais compostos/agentes em conjunto com instruções para administração a uma população de pacientes em que o outro ou outros dos dois ou mais compostos/agentes foram (ou estão a ser) administrados;

- material compreendendo pelo menos um dos dois ou mais compostos/agentes numa quantidade ou numa forma que é especificamente adaptada para utilização em combinação com o outro ou outros dos dois ou mais compostos/agentes.

Tal como aqui utilizado, o termo "em combinação" pode referir-se a compostos/agentes que são administrados como parte do mesmo regime de tratamento global. Como tal, a posologia de cada um dos dois ou mais compostos/agentes pode diferir: cada um pode ser administrado ao mesmo tempo ou em momentos diferentes. Será por isso apreciado que os compostos/agentes da combinação possam ser administrados sequencialmente (p. ex., antes ou depois) ou simultaneamente, quer na mesma formulação farmacêutica (i.e. em conjunto), ou em formulações farmacêuticas diferentes (i.e. separadamente). Simultaneamente na mesma formulação é como uma formulação unitária enquanto que simultaneamente em diferentes formulações farmacêuticas é não unitária. As posologias de cada um dos dois ou mais compostos/agentes numa terapia de combinação podem também diferir em relação à via de administração.

Tal como aqui utilizado, o termo "estojo farmacêutico" define uma série de uma ou mais doses unitárias de uma composição farmacêutica em conjunto com meios de dosagem (p. ex. dispositivo de medição) e/ou meios de distribuição (p. ex. inalador ou seringa), opcionalmente todos contidos dentro de uma embalagem externa comum. Em estojos farmacêuticos compreendendo uma combinação de dois ou mais compostos/agentes, os compostos/agentes individuais podem ser formulações unitárias ou não unitárias. A dose ou doses unitárias podem estar contidas dentro uma embalagem de

bolhas. O estojo farmacêutico pode compreender ainda opcionalmente instruções para utilização.

Tal como aqui utilizado, o termo "embalagem farmacêutica" define uma série de uma ou mais dose unitárias de uma composição farmacêutica, contida opcionalmente dentro de uma embalagem externa comum. Em embalagens farmacêuticas compreendendo uma combinação de dois ou mais compostos/agentes, os compostos/agentes individuais podem ser formulações unitárias ou não unitárias. A dose ou doses unitárias podem estar contidas dentro de uma embalagem de bolhas. A embalagem farmacêutica pode compreender ainda opcionalmente instruções para utilização.

Tal como aqui utilizado, o termo "embalagem do paciente", define uma embalagem, prescrita a um paciente, que contém composições farmacêuticas para todo o curso do tratamento. As embalagens do paciente contêm geralmente uma ou mais embalagens de bolhas. As embalagens do paciente têm uma vantagem sobre as prescrições tradicionais, onde um farmacêutico divide o fornecimento do paciente de um produto farmacêutico a partir de um fornecimento a granel, em que o paciente tem sempre acesso ao folheto da embalagem contido na embalagem do paciente, normalmente em falta nas prescrições de paciente. Mostrou-se que a inclusão de um folheto melhora a adesão do paciente às instruções do médico.

As seguintes preferências e definições gerais são aplicáveis aos substituintes  $R^1$ ,  $R^2$  e  $R^3$  a menos que o contexto indique o contrário.

O termo "alquilo" tal como aqui utilizado é utilizado no seu sentido convencional para significar um grupo com a fórmula empírica  $C_nH_{2n+1}$  em que  $n$  é um número inteiro (p. ex. 1 a 6). O termo "alquilo" cobre tanto grupos alquilo de cadeia linear como de cadeia ramificada. Exemplos de grupos alquilo incluem metilo, etilo, propilo, isopropilo, *n*-butilo, isobutilo, *terc*-butilo, *n*-pentilo, 2-pentilo, 3-pentilo, 2-metil-butilo, 3-metil-butilo, e *n*-hexilo e seus isómeros. Dentro do subconjunto de grupos alquilo possuindo 1 a 6 átomos de carbono, exemplos particulares são grupos alquilo  $C_{1-4}$  (p. ex. grupos alquilo  $C_{1-3}$  ou grupos alquilo  $C_{1-2}$  ou grupos alquilo  $C_{2-3}$  ou grupos alquilo  $C_{2-4}$ ).

O termo "cicloalquilo" tal como aqui utilizado é utilizado no seu sentido convencional para designar um grupo alquilo cíclico com a fórmula empírica  $C_nH_{2n-1}$  em que  $n$  é um número inteiro. Exemplos de tais grupos cicloalquilo incluem ciclopropilo, ciclobutilo, ciclopentilo e ciclo-hexilo.

O termo "alcenilo" tal como aqui utilizado é utilizado no seu sentido convencional para significar um grupo hidrocarboneto acíclico contendo uma ou mais ligações duplas carbono-carbono, e de preferência uma única ligação dupla carbono-carbono. Exemplos de grupos alcenilo incluem etenilo (vinilo), 1-propenilo, 2-propenilo (alilo), isopropenilo, butenilo e buta-1,4-dienilo.

O termo "alcinilo" tal como aqui utilizado é utilizado no seu sentido convencional para significar um grupo hidrocarboneto contendo uma ligação tripla carbono-carbono. Um grupo acinilo preferido é um grupo propargilo.

O prefixo " $C_{x-y}$ " (em que x e y são números inteiros) tal como aqui utilizado refere-se ao número de átomos de carbono num dado grupo. Assim, um grupo alquilo  $C_{1-4}$  contém de 1 a 4 átomos de carbono, um grupo cicloalquilo  $C_{3-6}$  contém de 3 a 6 átomos de carbono, um grupo alcoxilo  $C_{1-4}$  contém de 1 a 4 átomos de carbono, e assim por diante.

O termo "alcoxilo", tal como aqui utilizado, é utilizado no seu sentido convencional para significar um grupo de fórmula empírica  $OC_nH_{2n+1}$  onde n é um número inteiro (p. ex. 1 a 6). Exemplos de grupos alcoxilo são metoxilo, etoxilo, propoxilo, isopropoxilo, butoxilo, 1-metilpropoxilo, 2-metilpropoxilo e terc-butoxilo.

O termo "anel heterocíclico saturado" tal como aqui utilizado para um grupo cíclico não contendo ligações múltiplas (p. ex. ligações duplas) entre membros adjacentes do anel e contendo um ou mais membros do anel heteroátomos sendo os restantes membros do anel átomos de carbono. A menos que indicado de outra forma, o anel heterocíclico saturado contém um ou dois membros do anel heteroátomos seleccionados a partir de O, N e S e formas oxidadas de N e S. Grupos heterocíclicos saturados preferidos são aqueles possuindo 5 ou seis membros no anel. Exemplos de grupos heterocíclicos saturados incluem azetidina, pirrolidina, piperidina, azepina, morfolina, tiomorfolina, S-óxido e S,S-dióxido, piperazina, e N-metil-piperazina. Grupos heterocíclicos saturados particulares são pirrolidina, piperidina, morfolino, piperazina, e N-metil-piperazina.

O termo "arilo" tal como aqui utilizado é utilizado no seu sentido convencional para designar um grupo aromático em que os membros do anel são todos átomos de carbono. O grupo

arilo pode ser monocíclico ou bicíclico e pode portanto ser um grupo fenilo ou um grupo naftilo. O grupo arilo pode ser não substituído ou substituído com até 4 substituintes, mais tipicamente até 3 substituintes e de preferência até 2 substituintes. No contexto do grupo substituinte  $R^{12}$  aqui, o grupo arilo é de preferência monocíclico e é um grupo fenilo opcionalmente substituído em que os substituintes opcionais para o grupo fenilo são seleccionados a partir de alquilo  $C_{1-4}$  (p. ex. metilo), halogéneo (p. ex. cloro, flúor ou bromo), ciano, trifluorometilo, trifluorometoxilo, difluorometoxilo, alcoxilo  $C_{1-4}$  (p. ex. metoxilo), metilenodioxilo. Numa forma de realização geral, uma parte formando um grupo arilo do grupo substituinte  $R^{12}$  pode ser fenilo não substituído ou fenilo substituído por um ou dois substituintes seleccionados a partir de metilo, metoxilo, flúor ou cloro.

Os vários grupos funcionais e substituintes constituindo os compostos de fórmulas (1a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, são tipicamente escolhidos de modo a que o peso molecular do composto da invenção não seja superior a 1000. Mais geralmente, o peso molecular do composto será menos do que 750, por exemplo menos do que 700, ou menos do que 650, ou menos do que 600, ou menos do que 550. De maior preferência, o peso molecular é menos do que 525 e, por exemplo, é de 500 ou menos.

#### Sais, Solvatos, Tautómeros, Isómeros, N-Óxidos e Isótopos

Uma referência a um composto de fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes incluem também formas

iônicas, sais, solvatos, isómeros, tautómeros, N-óxidos, ésteres, isótopos e formas protegidas destes, por exemplo, tal como discutido abaixo; de preferência, os sais ou tautómeros ou isómeros ou N-óxidos ou solvatos destes; e de maior preferência, os sais ou tautómeros ou N-óxidos ou solvatos destes.

Muitos dos compostos podem existir na forma de sais, por exemplo sais de adição ácida ou, em certos casos sais de bases orgânicas e inorgânicas tais como sais fenolato, carboxilato, sulfonato e fosfato. Todos esses sais estão dentro do âmbito desta invenção, e referências a compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, incluem as formas de sal dos compostos.

Os sais da presente invenção podem ser sintetizados a partir do composto original que contém uma porção básica ou ácida através de métodos químicos convencionais tais como os métodos descritos em "Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use", P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), ISBN: 3-90639-026-8, Capa dura, 388 páginas, Agosto 2002. Geralmente, tais sais podem ser preparados fazendo reagir as formas de ácido ou base livres destes compostos com a base ou ácido apropriado em água ou num solvente orgânico, ou numa mistura dos dois; geralmente, são utilizados meios não aquosos como éter, acetato de etilo, etanol, isopropanol ou acetonitrilo.

Sais de adição ácida podem ser formados com uma ampla variedade de ácidos, tanto inorgânicos como orgânicos. Exemplos de sais de adição ácida incluem sais formados com um ácido seleccionado a partir do grupo que consiste em

ácidos acético, 2,2-dicloroacético, adípico, algínico, ascórbico (p. ex. L-ascórbico), L-aspartico, benzenossulfónico, benzóico, 4-acetamidobenzóico, butanóico, (+)-canfórico, canfor-sulfónico, (+)-(1S)-canfor-10-sulfónico, cáprico, capríco, caprílico, cinâmico, cítrico, ciclâmico, dodecilsulfúrico, etano-1,2-dissulfónico, etanossulfónico, 2-hidroxi-etanossulfónico, fórmico, fumárico, galactárico, gentísico, gluco-heptónico, D-glucónico, glucurónico (p. ex. D-glucurónico), glutâmico (p. ex. L-glutâmico),  $\alpha$ -oxoglutárico, glicólico, hipúrico, bromídrico, clorídrico, iodídrico, isetiónico, (+)-L-láctico, ( $\pm$ )-DL-láctico, lactobiónico, maleico, málico, (-)-L-málico, malónico, ( $\pm$ )-DL-mandélico, metanossulfónico, naftaleno-2-sulfónico, naftaleno-1,5-dissulfónico, 1-hidrox-2-naftóico, nicotínico, nítrico, oleico, orótico, oxálico, palmítico, pamóico, fosfórico, propiónico, L-pirolutâmico, salicílico, 4-amino-salicílico, sebácico, esteárico, succínico, sulfúrico, tânico, (+)-L-tartárico, tiociânico, *p*-toluenossulfónico, undecilénico e valérico, bem como aminoácidos acilados e resinas de permuta catiónica.

Se o composto for aniónico, ou tiver um grupo funcional que possa ser aniónico (p. ex.,  $\text{-COOH}$  pode ser  $\text{-COO-}$ ), então um sal pode ser formado com um catião adequado. Exemplos de catiões inorgânicos adequados incluem, mas não se limitam a, iões de metais alcalinos, tais como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , catiões de metais alcalino-terrosos, tais como  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Mg}^{2+}$ , e outros catiões tais como  $\text{Al}^{3+}$ . Exemplos de catiões orgânicos adequados incluem, mas não se limitam a, ião de amónio (i.e.,  $\text{NH}_4^+$ ) e iões de amónio substituídos (p. ex.,  $\text{NH}_3\text{R}^+$ ,  $\text{NH}_2\text{R}_2^+$ ,  $\text{NHR}_3^+$ ,  $\text{NR}_4^+$ ). Exemplos de alguns iões de amónio substituídos adequados são aqueles derivados de: etilamina,



dietilamina, diciclo-hexilamina, trietilamina, butilamina, etilenodiamina, etanolamina, dietanolamina, piperazina, benzilamina, fenilbenzilamina, colina, meglumina, e trometamina, bem como aminoácidos tais como lisina e arginina. Um exemplo de um ião de amónio quaternário comum é  $N(CH_3)_4^+$ .

Quando os compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes contêm uma função amina, estes podem formar sais de amónio quaternários, por exemplo através de reacção com um agente de alquilação de acordo com métodos bem conhecidos dos peritos. Tais compostos de amónio quaternários estão dentro do âmbito das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes.

As formas de sal dos compostos da invenção são tipicamente sais farmacologicamente aceitáveis, e exemplos de sais farmacologicamente aceitáveis são discutidos em Berge *et al.*, 1977, "Pharmaceutically Acceptable Salts", *J. Pharm. Sci.*, Vol. 66, págs. 1-19. No entanto, sais que não sejam farmacologicamente aceitáveis podem também ser preparados como formas intermédias que podem então ser convertidas em sais farmacologicamente aceitáveis. Tais formas de sais farmacologicamente não aceitáveis que podem ser úteis, por exemplo, na purificação ou separação dos compostos da invenção, fazem também parte da invenção.

Os compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c), e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes contendo uma função amina podem também formar N-óxidos. Uma referência aqui a um composto de

qualquer uma das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes que contém uma função amina inclui também o N-óxido.

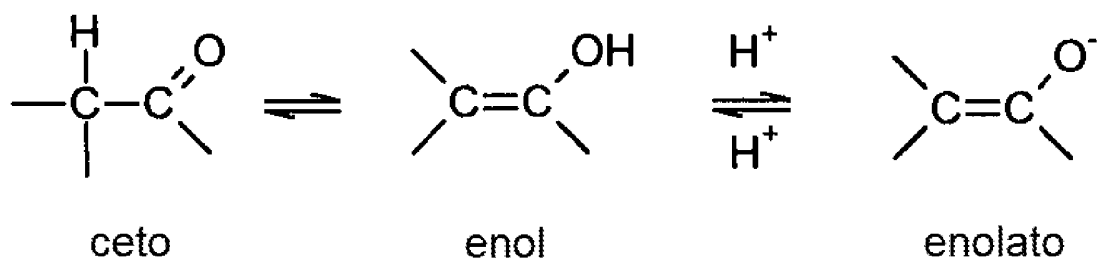
Quando um composto contém várias funções amina, um ou mais do que um átomo de azoto pode ser oxidado para formar um N-óxido. Exemplos particulares de N-óxidos são os N-óxidos de uma amina terciária ou um átomo de azoto de um heterociclo contendo azoto.

Os N-óxidos podem ser formados através de tratamento da amina correspondente com um agente oxidante tal como peróxido de hidrogénio ou um per-ácido (p. ex., um ácido peroxicarboxílico), ver por exemplo "Advanced Organic Chemistry", de Jerry March, 4ª Edição, Wiley Interscience, páginas. Mais particularmente, os N-óxidos podem ser produzidos através do procedimento de L. W. Deady (*Syn. Comm.* 1977, 7: 509-514) em que o composto amina é feito reagir com ácido *m*-cloroperoxibenzóico (MCPBA), por exemplo, num solvente inerte, tal como diclorometano.

Os compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, podem existir em várias formas geométricas, isoméricas, e tautoméricas diferentes e as referências a compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, incluem todas essas formas. Para evitar dúvidas, quando um composto pode existir numa de várias formas geométricas isoméricas ou tautoméricas e somente um é especificamente descrito ou mostrado, todos os outros estão contudo englobados pelas fórmulas (1 a), (1

b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes.

Exemplos de formas tautoméricas incluem, por exemplo, as formas ceto, enol e enolato, tal como em, por exemplo, os seguintes pares tautoméricos: ceto/enol (ilustrado abaixo), imina/enamina, amida/álcool imino, amidina/amidina, nitroso/oxima, tiocetona/enetiol, e nitro/aci-nitro.



Quando os compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, contêm um ou mais centros quirais, e podem existir na forma de dois ou mais isómeros ópticos, referências aos compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, incluem todas as formas isoméricas ópticas destes (p. ex., enantiómeros, epímeros e diastereoisómeros), quer como isómeros ópticos individuais, ou misturas (p. ex. misturas racémicas) ou dois ou mais isómeros ópticos, a não ser que o contexto exija o contrário.

Os isómeros ópticos podem ser caracterizados e identificados pela sua actividade óptica (i.e. como isómeros + e -, ou isómeros d e l) ou podem ser caracterizados em termos da sua estereoquímica absoluta, utilizando a nomenclatura "R e S" desenvolvida por Cahn,

Ingold e Prelog, ver "Advanced Organic Chemistry" por Jerry March, 4ª Edição, John Wiley & Sons, New York, 1992, páginas 109-114, e ver também Cahn, Ingold & Prelog, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1966, 5: 385-415.

Os isómeros ópticos podem ser separados através de um número de técnicas incluindo cromatografia quiral (cromatografia num suporte quiral) e tais técnicas são bem conhecidas dos peritos na técnica.

Como alternativa à cromatografia quiral, os isómeros ópticos podem ser separados através da formação de sais diastereoisoméricos com ácidos quirais, tais como ácido (+)-tartárico, ácido (-)-piroglutâmico, ácido (-)-di-toluoil-L-tartárico, ácido (+)-mandélico, ácido (-)-málico, e (-)-canforsulfónico, separando os diastereoisómeros através de cristalização preferencial, e em seguida dissociando os sais para produzir o enantiómero individual de base livre.

Quando os compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, existem como duas ou mais formas isoméricas ópticas, um enantiómero num par de enantiómeros pode exibir vantagens em relação ao outro enantiómero, por exemplo, em termos de actividade biológica. Assim, em certas circunstâncias, pode ser desejável utilizar como um agente terapêutico apenas um de um par de enantiómeros, ou apenas um de uma pluralidade de diastereoisómeros. Deste modo, a invenção proporciona composições contendo os compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, possuindo um ou mais

centros quirais, em que pelo menos 55% (p. ex. pelo menos 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% ou 95%) do composto da invenção está presente como um único isómero óptico (p. ex. enantiómero ou diastereoisómero). Numa forma de realização geral, 99% ou mais (p. ex. substancialmente todo) da quantidade total do composto das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, podem estar presentes como um único isómero óptico (p. ex. enantiómero ou diastereoisómero).

Os compostos da invenção incluem compostos com uma ou mais substituições isotópicas, e uma referência a um elemento particular inclui no seu âmbito todos os isótopos do elemento. Por exemplo, uma referência a hidrogénio inclui no seu âmbito  $^1\text{H}$ ,  $^2\text{H}$  (D), e  $^3\text{H}$  (T). Da mesma forma, as referências a carbono e oxigénio incluem no seu âmbito, respectivamente,  $^{12}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  e  $^{14}\text{C}$  e  $^{16}\text{O}$  e  $^{18}\text{O}$ .

Os isótopos podem ser radioactivos ou não radioactivos. Numa forma de realização da invenção, os compostos não contêm isótopos radioactivos. Tais compostos são preferidos para utilização terapêutica. Noutra forma de realização, no entanto, o composto pode conter um ou mais radioisótopos. Compostos contendo tais radioisótopos podem ser úteis num contexto de diagnóstico.

Também englobados pela fórmula (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, estão quaisquer formas polimórficas dos compostos, solvatos (p. ex. hidratos) e complexos (p. ex. complexos de inclusão ou clatratos com compostos tais como ciclodextrinas, ou complexos com metais) dos compostos.

Solvatos preferidos são solvatos formados através da incorporação na estrutura em estado sólido (p. ex. estrutura cristalina) dos compostos da invenção de moléculas de um solvente farmacologicamente aceitável não tóxico (em seguida referido como solvente de solvatação). Exemplos de tais solventes incluem água, álcoois (tais como etanol, isopropanol e butanol) e dimetilsulfóxido. Os solvatos podem ser preparados através de recristalização dos compostos da invenção com um solvente ou mistura de solventes contendo o solvente de solvatação. Tenha ou não se formado um solvato, em qualquer caso pode ser administrado através da submissão de cristais do composto a análise utilizando técnicas bem conhecidas e padrão tais como análise termogravimétrica (TGE), calorimetria de varrimento diferencial (DSC) e cristalografia de raios-X.

Os solvatos podem ser solvatos estequiométricos ou não estequiométricos.

Solvatos particularmente preferidos são os hidratos, e exemplos de hidratos incluem hemi-hidratos, mono-hidratos e di-hidratos.

Para uma discussão mais detalhada dos solvatos e dos métodos utilizados para os produzir e caracterizar, ver Bryn *et al.*, "Solid-State Chemistry of Drugs", Segunda Edição, publicado por SSCI, Inc. de West Lafayette, IN, USA, 1999, ISBN 0-967-06710-3.

Actividade Biológica e Utilizações Terapêuticas

Os compostos das fórmulas (1 a), (1 b), (1 c) e Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos e preferências e exemplos destes, são considerados pró-fármacos de compostos que são inibidores de Hsp90.

Os compostos pró-fármacos da invenção podem ter várias vantagens em relação aos seus compostos originais. Por exemplo, podem proporcionar uma melhor biodisponibilidade oral, p. ex. em virtude de melhor absorção intestinal. Além disso, através da formação de um pró-fármaco, a conjugação e/ou o metabolismo do composto original pode ser substancialmente reduzido.

Espera-se que os compostos pró-fármacos da invenção sejam benéficos no tratamento de um amplo espectro de distúrbios proliferativos. Exemplos de tais distúrbios proliferativos incluem, mas não estão limitados a, carcinoma, por exemplo um carcinoma da bexiga, da mama, do cólon (p. ex. carcinomas colorrectais tais como adenocarcinoma do cólon e adenoma do cólon), do rim, da epiderme, do fígado, do pulmão, por exemplo adenocarcinoma, cancro do pulmão de células pequenas e carcinomas do pulmão de células não pequenas, do esófago, da vesícula biliar, do ovário, do pâncreas, p. ex. carcinoma pancreático exócrino, do estômago, do colo do útero, da tiróide, da próstata, do sistema gastrointestinal, p. ex. tumores do estroma gastrointestinal, ou da pele, por exemplo carcinoma de células escamosas; um tumor hematopoético de linhagem linfóide, por exemplo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B (tal como linfoma difuso de grandes células B), linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, linfoma de células pilosas, ou linfoma de Burkitt; um tumor

hematopoético de linhagem mielóide, incluindo leucemia mielóide aguda, leucemias mielóides crónicas, leucemias mielogenosas e leucemias mielogenosas crónicas sensíveis e refractárias a Imatinib, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo sensível e refractário a Bortezomib, doença mieloproliferativa ou leucemia promielocítica; cancro folicular da tiróide; um tumor de origem mesenquimatosa, por exemplo fibrossarcoma ou rabdomiossarcoma; um tumor do sistema nervoso central ou periférico, por exemplo astrocitoma, neuroblastoma, glioma (um glioma de grau elevado) ou schwannoma; melanoma (p. ex. melanoma maligno ou metastático); seminoma; teratocarcinoma; osteossarcoma; queratoacantoma; cancro folicular da tiróide; ou sarcoma de Kaposi. Um outro exemplo de um tumor de origem mesenquimatosa é o sarcoma de Ewing.

Um subgrupo de cancros inclui um carcinoma, por exemplo um carcinoma da bexiga, da mama, do cólon (p. ex. carcinomas colorrectais tais como adenocarcinoma do cólon e adenoma do cólon), do rim, da epiderme, do fígado, do pulmão, por exemplo adenocarcinoma, cancro do pulmão de células pequenas e carcinomas do pulmão de células não pequenas, da vesícula biliar, do ovário, do pâncreas, p. ex. carcinoma pancreático exócrino, do estômago, da tiróide, da próstata, do sistema gastrointestinal, p. ex. tumores do estroma gastrointestinal, ou da pele, por exemplo carcinoma de células escamosas; um tumor hematopoético de linhagem linfóide, por exemplo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B (tal como linfoma difuso de grandes células B), linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, linfoma de células pilosas, ou linfoma de Burkitt; um tumor hematopoético de linhagem mielóide, incluindo leucemia



mielóide aguda, leucemias mielóides crónicas, leucemias mielogenosas, e leucemias mielogenosas crónicas sensíveis e refractárias a Imatinib, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo sensível e refractário a Bortezomib, doença mieloproliferativa ou leucemia promielocítica; cancro folicular da tiróide; um tumor de origem mesenquimatosa, por exemplo fibrossarcoma ou rabdomiossarcoma; um tumor do sistema nervoso central ou periférico, por exemplo astrocitoma, glioma (um glioma de grau elevado); melanoma (p. ex., melanoma maligno ou metastático); osteossarcoma; ou cancro folicular da tiróide. Outro exemplo de um tumor de origem mesenquimatosa é o sarcoma de Ewing.

Um grupo preferido de cancros consiste em tumores sólidos seleccionados a partir de cancro da mama metastático que seja positivo para HER2; adenocarcinoma da próstata; melanoma metastático; carcinoma do pulmão de células não pequenas (NSCLC); carcinoma do pulmão de células pequenas (SCLC); gliomas de grau elevado; tumores do estroma gastrointestinal (GIST); cancro colorrectal; glioblastoma; melanoma; cancro da tiróide metastático; cancro da próstata; e cancro rectal.

Dentro deste grupo de cancros, um subgrupo particular consiste em cancro colorrectal; glioblastoma; melanoma; cancro da tiróide metastático; cancro da próstata; e cancro rectal.

Os cancros podem ser cancros que sejam sensíveis à inibição de Hsp90, e tais cancros podem ser determinados através de um método tal como exposto na secção intitulada "Métodos de Diagnóstico".

Um grupo de cancros inclui cancros da mama humanos (p. ex. tumores primários da mama, cancro da mama negativo para nódulos, adenocarcinomas invasivos do ducto da mama, cancros da mama não-endometrióide); e linfomas de células do manto. Além disso, outros cancros são cancros colorrectais e endometriais.

Outro subconjunto de cancros inclui tumores hematopoéticos tanto da linhagem linfóide como da mielóide, por exemplo leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica crónica (tanto de células T como B), leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crónica, linfoma de células do manto e linfoma de células B (tal como linfoma difuso de grandes células B) e ainda inclui opcionalmente leucemia mielogenosa crónica e mieloma múltiplo.

Um subconjunto preferido de cancros consiste em cancro da mama positivo para ErbB2, da próstata, do pulmão, e gástrico; leucemia mielóide crónica; cancro da próstata dependente do receptor de androgénio; leucemia mielóide aguda dependente de Flt3; melanoma associado a mutação de Braf; mieloma múltiplo; mieloma múltiplo refractário a Velcade; e tumores do estroma gastrointestinal (GIST).

Destes, cancros particularmente preferidos são mielomas múltiplos e tipos de tumores refractários a Velcade tal como aqui definidos.

Outro subconjunto preferido de cancros consiste em cancro da próstata refractário a hormonas, melanoma metastático, cancro de mama positivo para HER2, carcinoma do pulmão de células não pequenas positivo para EGFR mutante e tumores do estroma gastrointestinal resistentes a Gleevec.

Um outro subconjunto preferido de cancros consiste em cancro da próstata refractário a hormonas, melanoma metastático, cancro da mama positivo para HER2, carcinoma do pulmão de células não pequenas positivo para EGFR mutante, carcinoma do pulmão de células pequenas e tumores do estroma gastrointestinal.

Inibidores de Hsp90 podem também ser utilizados para tratar outras condições tais como infecções virais, doenças parasitárias, doenças auto-imunes (p. ex. esclerose múltipla e lúpus eritematoso), distúrbios neurodegenerativos (p. ex. doença de Alzheimer), inflamação, diabetes de Tipo I e II, aterosclerose, doença cardíaca e xerodermia pigmentosa (um distúrbio de múltiplos sistemas herdado de reparação do ADN que não é um cancro, mas que tem uma predisposição para cancro da pele induzido por UV).

Os inibidores de Hsp90 podem também ter benefício clínico em transplante e imunossupressão.

Os inibidores de Hsp90 podem também ter benefício clínico nas doenças anteriormente descritas, quando usados em combinação com agentes terapêuticos existentes ou novos.

Com base nas actividades de proteínas clientes de Hsp90 e evidências experimentais, os seguintes distúrbios podem ser particularmente sensíveis a tratamento através de inibidores de Hsp90.

Cancro da mama positivo para ErbB2, da próstata, do pulmão, e gástrico

A sobre-expressão de ErbB2 (HER-2) ocorre em aproximadamente 30% dos cancros de mama e está ligada a um fraco prognóstico e resistência a fármacos (Tsugawa *et al.*, 1993, *Oncology* 1993; 50: 418).

#### EGFR mutante em cancro do pulmão

Mutações somáticas no domínio cinase do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR), incluindo L858R e deleções do exão 19, estão subjacentes à capacidade de resposta a gefitinib e erlotinib em cancro do pulmão de células não pequenas (NSCLC). A resistência adquirida a estes inibidores da tirosina-cinase é, em alguns casos, mediada por uma segunda mutação, T790M. Antibióticos de ansamicina, tais como geldanamicina, inibem fortemente a proteína de choque térmico 90 (Hsp90), promovendo a degradação mediada por ubiquitina de cinases oncogénicas que requerem a chaperona para dobragem conformacional correcta. A exposição de linhas celulares mutantes para EGFR a geldanamicina induziu uma marcada depleção de fosfo-Akt e ciclina D1, bem como apoptose. Estes dados sugerem que a activação mutacional de EGFR está associada a dependência de Hsp90 para estabilidade e que a inibição de Hsp90 pode representar uma nova estratégia para o tratamento de NSCLC mutante para EGFR.

#### Leucemia mielóide crónica

A proteína BCR-ABL aberrante é criada através de uma translocação cromossómica e resulta num domínio cinase Abl constitutivamente activo. Mostrou-se que este evento de translocação é causal para CML. P210BcrAbl é uma conhecida

proteína cliente de Hsp90. O tratamento da linha celular positiva para BCR-Abl K562 com um inibidor de hsp90 induziu apoptose. O inibidor de Bcr-Abl Gleevec<sup>®</sup> também induz apoptose em células K562; no entanto, as células K562 resistentes a Gleevec<sup>®</sup> mantêm ainda sensibilidade para inibidores de Hsp90 (Gorre et al., 2002, *Blood* 100: 3041-3044).

#### Cancro da próstata dependente do receptor de androgénio

A cinase do receptor de androgénio é um proteína cliente de Hsp90. A testosterona é ainda a principal terapia para doença não localizada, embora o desenvolvimento de resistência seja inevitável. Nalguns casos, a resistência desenvolve-se como consequência de uma mutação ocorrendo no receptor de androgénio conferindo sinalização independente do ligando. Nestas circunstâncias, a sub-regulação da expressão do receptor de androgénio após inibição de Hsp90 representa uma potencial abordagem terapêutica.

Existe um sistema paralelo em cancros da mama dependentes de estrogénio.

#### Leucemia mielóide aguda dependente de Flt3

A duplicação interna do receptor tirosina-cinase Flt3 conduz à sua activação constitutiva e oncogénese. Estas duplicações internas são observadas em 20% de todos os casos relatados de AML e são uma indicação de mau prognóstico. Mostrou-se que a inibição da sinalização de Flt3 conduz a respostas transientes. Prevê-se que os inibidores de Hsp90 tenham benefício clínico para estes

pacientes uma vez que Flt3 é uma proteína cliente de Hsp90 (Bali et al., 2004 *Cancer Res.* 64(10): 3645-52).

#### Melanoma associado a mutação de Braf

Braf codifica para uma serina/treonina-cinase que está mutada em 70% de todos os melanomas. 80% destes representam uma única mutação pontual V599E que confere elevada actividade de cinase a BRAF. Esta mutação é também transformante em células NIH3T3 (Bignell et al., 2002 *Nature*, 417(6892): 949-54).

#### Mieloma Múltiplo

O inibidor de Hsp90 17-AAG inibe potentemente a proliferação de linhas celulares de mieloma múltiplo refractário a Bortezomib. Níveis da superfície celular de IGF-1R e IL-6R também foram reduzidos em células MM-1 tratadas com 17-AAG (Mitsiades et al., *Blood* 107: 1092-1100, 2006). A estimulação autócrina de células de mieloma múltiplo, bem como a estimulação parácrina de células do estroma da medula óssea com IL-6 é também diminuída através de sub-regulação da IKK cliente de Hsp90.

#### Cancros Refractários a Bortezomibe (Velcade)

Os compostos da presente invenção podem ser utilizados no tratamento de tipos de tumores refractários a Velcade incluindo o tratamento de pacientes com mieloma múltiplo, linfoma das células do manto, linfoma não-Hodgkin indolente, carcinoma bronquioloalveolar de estágio IIIB e IV, cancro avançado do pulmão de células não pequenas,

cancros da mama, da próstata e do ovário e linfoma não-Hodgkin.

### Tumores do estroma gastrointestinal (GIST)

Os tumores GIST são particularmente dependentes de doença de activação ou sobre-expressão de factores de crescimento (p. ex. c-kit).

### B-CLL

ZAP-70 é uma proteína cliente de Hsp90 em linfócitos em circulação de pacientes com CLL, mas não em células T correspondentes onde esta cinase é normalmente expressa. Assim, ZAP-70 é única entre as clientes de Hsp90 identificadas por a sua dependência de chaperona ser *condicional* do tipo de célula em que é expressa.

Outras condições ou distúrbios para os quais um inibidor de Hsp90 pode ter benefício clínico incluem, mas não se limitam a:

### Distúrbios neurodegenerativos

A doença de Huntington (HD) é um distúrbio neurodegenerativo progressivo sem tratamento eficaz. A inibição por GA da Hsp90 e a resultante sobre-regulação de Hsps é eficaz na prevenção de agregação da proteína de huntington em células neuronais (Sittler et al., 2001, *Human Molecular Genetics*, Vol. 10, No. 12 1307-1315). A sobre-regulação de HSP pode também ter benefício clínico noutras doenças de dobragem errada das proteínas, p. ex. CJD e Alzheimer.

Doença inflamatória, incluindo Artrite reumatóide, Asma, Doença pulmonar obstrutiva crónica, e doença inflamatória intestinal

Mostrou-se que GA dissocia HSF-1 de Hsp90 conduzindo à activação e translocação nuclear de HSF-1. HSF-1 actua subsequentemente como um factor de transcrição para induzir Hsp90 e Hsp70. A indução de Hsp70 foi implicada na resolução de inflamação num modelo de edema induzido de ratinho (Lanaro et al., 2004 *Human Molecular Genetics*, 2001, Vol. 10, No. 12 1307-1315). Adicionalmente, o tratamento com GA inibiu a activação de IkappaB-cinase (IKK) por TNF- $\alpha$  ou PMA. IKK é um regulador de Nf-kB e Ap-1 (Broemer et al. 2004). Ap-1 e Nf-kB é um factor de transcrição principal conduzindo à produção de citocinas pró-inflamatórias (Yeo et al., 2004 *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 30; 320(3): 816-24). A estabilidade de transcritos de citocinas pro-inflamatórias é também regulada através da inibição da MapK p38 (Wax et al., 2003, *Rheumatism* Vol. 48, No. 2, págs. 541-550).

Aterosclerose

Sabe-se que as células inflamatórias e imunitárias desempenham um papel central na iniciação e progressão da aterosclerose humana (Riganò et al., *Ann. NY Acad. Sci.*, 2007, 1107: 1-10) e foi proposto que a Hsp90 actua como um auto-antigénio na aterosclerose da carótida. Riganò et al. encontraram anticorpos e células específicos contra Hsp90 no soro de 60% dos pacientes testados que sofriam de placas ateroscleróticas da carótida, mas não anticorpos específicos ou células T dirigidos a Hsp90 no soro de



pacientes saudáveis. Portanto, inibidores de Hsp90 podem ser úteis no tratamento ou na prevenção de aterosclerose.

Doença relacionada com angiogénese, incluindo mas não se limitando a: angiogénese tumoral, psoríase, artrite reumatóide, e retinopatia diabética

A indução de angiogénese é regulada pelas proteínas clientes de Hsp90 eNOS e Akt em células endoteliais (Sun e Liao, 2004 *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24(12): 2238-44). A supressão do factor indutível por hipóxia (HIF)-1a pode também prejudicar o crescimento, a angiogénese e a maturação dos vasos de tumores gástricos num modelo de ratinho (Stoeltzing et al., 2004 *J. Natl. Cancer Inst.*; 96: 946-956).

Diabetes de tipo I e tipo II

A inibição de Hsp90 teve um profundo efeito na sinalização de Akt bem como e-nos. Estes são dois reguladores-chave da apoptose de células endoteliais induzida por glicose elevada em diabetes de tipo I (Lin et al., 2005, *J. Cell Biochem.* 1; 94 (1): 194-201) e o desenvolvimento de hipertensão em diabetes de tipo II (Kobayashi et al., *Hypertension* 44(6): 956-62).

Imunossupressão e transplante

Mostrou-se que a inibição de Hsp90 sub-regula Lck, uma tirosina-cinase específica de células T necessária para activação das células T (Yorgin et al., 2000, *J. Immunol.* 15; 164(6): 2915-23).

### Doença cardíaca

A isquemia cardíaca é a causa mais comum de morte no mundo ocidental. As Hsps, e nomeadamente a Hsp70 (induzida por tratamento com radicicol) demonstraram actividade cardioprotectora em cardiomiócitos de rato (Griffin *et al.*, 2004). A inibição de Hsp90 resulta na libertação de HSF-1 do complexo de chaperonas e a sua subsequente activação dos genes de Hsp. A inibição de Hsp90 leva também à sub-regulação de HIF-1, que foi implicada na patogénese de doença cardíaca isquémica e acidente vascular cerebral.

### Doença infecciosa

A protease NS2/3 viral da hepatite C é uma proteína cliente de Hsp90 e a actividade de Hsp90 é necessária para o processamento e a replicação viral (Whitney *et al.*, 2001. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 20; 98(24): 13931-5).

### Doença parasitária

A geldanamicina (GA) tem alegadamente actividade anti-malária contra um ortólogo de Hsp90 verificado em *Plasmodium falciparum*. O crescimento de *Plasmodium* foi inibido com GA a uma  $CI_{50}$  semelhante à observada com cloroquina. GA foi também eficaz contra estirpes de *Plasmodium falciparum* resistentes a cloroquina (Kumar *et al.*, 2003, *Malar. J.* 15, 2(1): 30).

### Inibição, Prevenção ou Reversão do Desenvolvimento de Resistência a Fármacos

Tal como discutido acima, moduladores ou inibidores da função das proteínas de stresse em geral (e Hsp90 em particular) representam uma classe de quimioterapêuticos com o potencial de: (i) sensibilizar células malignas a fármacos e/ou tratamentos anticancro; (ii) aliviar ou reduzir a incidência da resistência a fármacos e/ou tratamentos anticancro; (iii) reverter a resistência a fármacos e/ou tratamentos anticancro; (iv) potenciar a actividade de fármacos e/ou tratamentos anticancro; (v) retardar ou prevenir o surgimento de resistência a fármacos e/ou tratamentos anticancro.

Deste modo, a invenção proporciona ainda:

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método para a profilaxia ou o tratamento (ou alívio ou redução da incidência) de um estado ou condição de doença mediado por Hsp90, método esse que compreende a administração do composto a um sujeito a necessitar deste, em que o estado ou condição de doença mediado por Hsp90 é o desenvolvimento de resistência a um fármaco de cancro.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método para: (i) sensibilizar células malignas a um fármaco anticancro; (ii) aliviar ou reduzir a incidência de resistência a um fármaco anticancro; (iii) reverter a resistência a um fármaco anticancro; (iv) potenciar a actividade de um fármaco anticancro; (v) retardar ou prevenir o surgimento de resistência a um fármaco anticancro, método esse que compreendendo a administração do composto a um sujeito a necessitar deste.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método para o tratamento de um cancro, método esse que compreende a administração do composto a um sujeito a necessitar deste, método esse que é caracterizado pela ausência de resistência a fármacos.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método para a profilaxia ou o tratamento (ou alívio ou redução da incidência) de um estado ou condição de doença mediado por Hsp90 num sujeito submetido a tratamento com um agente terapêutico (tal como um agente anticancro), método esse que compreende a administração do composto ao sujeito, em que o estado ou condição de doença mediado por Hsp90 é o desenvolvimento de resistência ao referido agente terapêutico.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método para: (i) sensibilizar células malignas a um agente anticancro; (ii) aliviar ou reduzir a incidência de resistência a um agente anticancro; (iii) reverter a resistência a um agente anticancro; (iv) potenciar a actividade de um agente anticancro; (v) retardar ou prevenir o surgimento de resistência a um agente anticancro, método esse que compreende a administração do composto a um sujeito submetido a tratamento com o referido agente anticancro.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização

num método para o tratamento de um cancro num sujeito submetido a tratamento com um agente anticancro, método esse que compreende a administração do composto a um sujeito a necessitar deste, método esse que é caracterizado pela ausência de resistência a fármacos para o agente anticancro.

### Actividade Biológica

A actividade biológica (p. ex. como inibidores de Hsp90) dos compostos fenólicos a partir dos quais os compostos pró-fármacos da invenção são derivados, pode ser medida utilizando os ensaios expostos nos exemplos abaixo, por exemplo as experiências de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) descritas no Exemplo 46 e os ensaios de actividade anti-proliferativa descritos no Exemplo 47. O nível de actividade exibida por um dado composto no ensaio ITC pode ser definido em termos do valor de  $K_d$ , e os compostos preferidos da presente invenção são compostos possuindo um valor de  $K_d$  inferior a 1 micromolar, de maior preferência inferior a 0,1 micromolar. Nos ensaios de actividade anti-proliferativa, o nível de actividade apresentado por um determinado composto num ensaio pode ser definido em termos do valor de  $CI_{50}$ , e os compostos preferidos da presente invenção são compostos possuindo um valor de  $CI_{50}$  inferior a 1 micromolar, de maior preferência inferior a 0,1 micromolar.

### hERG

No final dos anos 1990 uma série de fármacos, aprovados pela FDA dos EUA, teve que ser retirada de venda nos EUA quando se descobriu que estavam implicados em mortes

causadas por mau funcionamento do coração. Foi subsequentemente verificado que um efeito secundário destes fármacos era o desenvolvimento de arritmias causadas pelo bloqueio dos canais hERG em células do coração. O canal hERG faz parte de uma família de canais iónicos de potássio, cujo primeiro membro foi identificado no final dos anos 1980 num mutante da mosca da fruta *Drosophila melanogaster* (ver Jan, L.Y. e Jan, Y.N. (1990). "A Superfamily of Ion Channels". *Nature*, 345(6277): 672). As propriedades biofísicas do canal iónico de potássio hERG são descritas em Sanguinetti, M.C., Jiang, C., Curran, M.E., e Keating, M.T. (1995). "A Mechanistic Link Between an Inherited and an Acquired Cardiac Arrhythmia: HERG encodes the lkr potassium channel". *Cell*, 81: 299-307, e Trudeau, M.C., Warmke, J.W., Ganetzky, B., e Robertson, G.A. (1995). "HERG, a Human Inward Rectifier in the Voltage-Gated Potassium Channel Family". *Science*, 269: 92-95.

A eliminação da actividade de bloqueio de hERG continua a ser uma consideração importante no desenvolvimento de qualquer novo fármaco.

Verificou-se que muitos dos compostos fenólicos dos quais os compostos pró-fármacos da presente invenção são derivados, têm baixa actividade de hERG e uma boa separação entre a actividade inibidora de Hsp90 e a actividade de hERG.

Compostos pró-fármacos preferidos são os compostos pró-fármacos de compostos fenólicos possuindo valores médios de  $CI_{50}$  contra hERG que são de mais de 30 vezes, ou mais de 40 vezes, ou mais de 50 vezes os valores de  $CI_{50}$  dos compostos

em ensaios de proliferação celular. Pró-fármacos preferidos são os pró-fármacos de compostos fenólicos possuindo valores médios de  $CI_{50}$  contra hERG que são superiores a 5  $\mu M$ , mais particularmente superiores a 10  $\mu M$ , e de maior preferência superiores a 15  $\mu M$ . Alguns compostos fenólicos a partir dos quais os compostos pró-fármacos da invenção são derivados têm valores médios de  $CI_{50}$  contra hERG que são superiores a 50  $\mu M$ .

Os compostos da invenção podem ter propriedades ADME vantajosas e, em particular, melhor biodisponibilidade oral do que os compostos fenólicos originais.

#### **Tratamento de dor, neuropatias, acidente vascular cerebral e condições relacionadas**

Os compostos da invenção têm uma actividade de inibição ou modulação de Hsp90 e podem assim ser úteis em utilização no tratamento, no alívio ou na prevenção de certas doenças e condições mediadas por cdk5.

Concordantemente, a invenção proporciona a utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para o tratamento de dor.

Noutro aspecto, a invenção proporciona a utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de acidente vascular cerebral.

Noutro aspecto, a invenção proporciona a utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico

de um medicamento para utilização como um agente neuroprotector.

Noutros aspectos, a invenção proporciona:

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização no tratamento de dor.
- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na redução ou eliminação de dor num paciente (p. ex. um mamífero tal como um humano) sofrendo de dor.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para utilização na redução ou eliminação de dor num paciente (p. ex. um mamífero tal como um humano) sofrendo de dor.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico um medicamento para o tratamento de qualquer um ou mais de nocicepção, dor somática, dor visceral, dor aguda, dor crónica, hiperalgesia, alodinia, dor pós-operatória, dor devido a hipersensibilidade, dor de cabeça, dor inflamatória (reumática, dentária, dismenorreia ou infecção), dor neurológica, dor músculo-esquelética, dor relacionada com cancro ou dor vascular.
- Um composto da invenção, tal como aqui definido para utilização no tratamento de qualquer uma ou mais de nocicepção, dor somática, dor visceral, dor aguda, dor crónica, hiperalgesia, alodinia, dor pós-operatória, dor devido a hipersensibilidade, dor de cabeça, dor inflamatória (reumática, dentária, dismenorreia ou infecção), dor neurológica, dor músculo-esquelética, dor relacionada com cancro ou dor vascular.
- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de acidente vascular cerebral.



- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método para a profilaxia ou o tratamento de acidente vascular cerebral num paciente tal como um mamífero (p. ex. humano), método esse que compreende a administração ao paciente de uma quantidade terapeuticamente eficaz do composto.
- Uma composto da invenção tal como aqui definido, para utilização como agente neuroprotector.
- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método de prevenção ou redução de dano neuronal num paciente sofrendo de acidente vascular cerebral, método esse que compreende a administração ao paciente de uma quantidade neuroprotectora eficaz do composto.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico um medicamento para a prevenção ou redução de risco de acidente vascular cerebral em pacientes em risco de acidente vascular cerebral, por exemplo um paciente exibindo qualquer um ou mais factores de risco seleccionados a partir de inflamação vascular, aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes, hiperlipidemia e fibrilhação auricular.
- Um composto da invenção tal como aqui definido, para a prevenção ou redução de risco em acidente vascular cerebral em pacientes em risco de acidente vascular cerebral, por exemplo um paciente exibindo qualquer um ou mais factores de risco seleccionados a partir de inflamação vascular, aterosclerose, hipertensão arterial, diabetes, hiperlipidemia e fibrilhação auricular.

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado ou condição de doença mediado por uma cinase dependente de ciclina 5.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado ou condição de doença mediado por uma cinase dependente de ciclina 5.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado ou condição de doença mediado por cdk5 ou p35.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado ou condição de doença mediado por cdk5 ou p35, sendo o referido estado ou condição de doença diferente de doença de Alzheimer, doença de Huntington ou doença de Creutzfeldt-Jakob.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado ou condição de doença mediado por cdk5 ou p35, sendo o referido estado ou condição de doença diferente de uma doença neurodegenerativa.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado ou condição de doença caracterizado por níveis elevados de cdk5 ou p35.
- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado ou condição de doença mediado por cdk5 ou p35, sendo o referido estado ou condição de doença diferente de doença de Alzheimer, doença de Huntington, ou doença de Creutzfeldt-Jakob.

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado ou condição de doença mediado por cdk5 ou p35, sendo o referido estado ou condição de doença diferente de uma doença neurodegenerativa.
- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado ou condição de doença caracterizado por níveis elevados de cdk5 ou p35.
- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de uma neuropatia, tal como uma neuropatia periférica, diferente de doença de Alzheimer, doença de Huntington, ou doença de Creutzfeldt-Jakob.
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de uma neuropatia, tal como uma neuropatia periférica, diferente de doença de Alzheimer, doença de Huntington, ou doença de Creutzfeldt-Jacob.

**Actividade antifúngica, antiprotozoária, antiviral e antiparasitária**

Os compostos da presente invenção e seus sais de adição ácida e formas cristalinas destes podem ter actividade antifúngica, actividade antiprotozoária e antiparasitária.

Em particular, os compostos da invenção podem ser úteis em tratamento de infecção por fungos, protozoários e parasitas patogénicos, em que a infecção pelo patógeno está normalmente associada a uma resposta de anticorpo a Hsp90.

Numa forma de realização, a invenção proporciona compostos da invenção tal como aqui definidos, para utilização como agentes antifúngicos.

Exemplos de fungos incluem os que são patogénicos no homem e noutros animais, por exemplo:

- espécies de *Candida*, tais como *Candida albicans* e *Candida tropicalis*;
- espécies de *Cryptococcus*, tais como *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcal meningitis*;
- espécies de *Aspergillus* tais como *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus niger*;
- espécies de *Microsporum* tais como *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum*;
- espécies de *Epidermophyton*;
- espécies de *Trichophyton* tais como *Trichophyton equinum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*;
- *Epidermophyton floccosum*;
- *Exophiala werneckii*;
- espécies de *Fusarium* tais como *Fusarium solani*;
- *Sporothrix schenckii*;
- espécies de *Penicillium* tais como *Penicillium rubrum*;
- espécies de *Alternaria*;
- *Ceratocystis piliifera*;
- *Chrysosporium pruinosum*;
- espécies de *Helminthosporium*;
- *Paecilomyces variotti*;
- leveduras, por exemplo *Saccharomyces cerevisiae* e espécies de *Pityrosporum* tais como *Pityrosporum orbiculare* e *Pityrosporum ovale*;
- espécies de *Histoplasma* tais como *Histoplasma capsulatum*;
- espécies de *Coccidioides*;
- espécies de *Paracoccidioides*; e

- espécies de *Blastomyces*.

Noutra forma de realização, a invenção proporciona compostos da invenção tal como aqui definidos, para utilização como agentes antiprotozoários.

Exemplos de protozoários incluem:

- *Trypanosoma cruzi*;
- espécies de *Leishmania*; por exemplo o complexo de *L. donovani* (*L. donovani*, *L. infantum*, e *L. chagasi*); o complexo de *L. mexicana* (3 espécies principais - *L. mexicana*, *L. amazonensis*, e *L. venezuelensis*); *L. tropica*; *L. major*, *L. aethiopica*; e o subgénero *Viannia* com quatro espécies principais (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) peruviana*);
- *Toxoplasma gondii*; e
- *Trichomonas vaginalis*.

Noutra forma de realização, a invenção proporciona compostos da invenção tal como aqui definidos, para utilização como agentes antiparasitários.

Exemplos de parasitas incluem vermes parasitas tais como:

- nemátodes parasitas tais como *Ascaris lumbricoides*;
- platelmintas parasitas tais como os vermes trematódes parasitas, p. ex. *Schistosoma mansoni*

A invenção proporciona também *inter alia*:

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado ou condição de doença fúngica, protozoária, ou parasitária (diferente de um estado ou condição de doença devido a *Plasmodium falciparum*), por exemplo um estado ou condição

de doença caracterizado por uma resposta de anticorpos a Hsp90.

- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado ou condição de doença fúngica, protozoária ou parasitária (diferente de um estado ou condição de doença devido a *Plasmodium falciparum*), por exemplo um estado ou condição de doença caracterizado por uma resposta de anticorpos a Hsp90.

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização na profilaxia ou no tratamento de um estado ou condição de doença fúngica, por exemplo um estado ou condição de doença caracterizado por uma resposta de anticorpos a Hsp90.

- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de um estado ou condição de doença fúngica, por exemplo um estado ou condição de doença caracterizado por uma resposta de anticorpos a Hsp90.

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização em prevenção, paragem ou reversão da infecção de um animal (tal como um mamífero, p. ex. um humano) por fungos patogénicos.

- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para prevenção, paragem ou reversão da infecção de um animal (tal como um mamífero, p. ex. um humano) por fungos patogénicos.

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para qualquer uma das utilizações e dos métodos expostos acima, e tal como aqui descrito noutra local.

- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para a

profilaxia ou o tratamento de qualquer um dos estados ou condições de doença aqui descritos.

- Uma combinação de um composto da invenção tal como aqui definido, com um composto auxiliar que é um agente antifúngico (p. ex. um agente antifúngico azol).

- Uma composição farmacêutica compreendendo um composto da invenção tal como aqui definido, com um composto auxiliar que é um agente antifúngico (p. ex. um agente antifúngico azol).

- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização em prevenção, redução ou reversão do desenvolvimento de resistência a um agente antifúngico, agente antiprotozoário ou agente antiparasitário (de preferência um agente antifúngico) co-administrado com ele.

- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para co-administração com um agente antifúngico, agente antiprotozoário ou agente antiparasitário (de preferência um agente antifúngico) para prevenir, reduzir ou reverter o desenvolvimento de resistência ao agente antifúngico, agente antiprotozoário ou agente antiparasitário.

- Um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) ou quaisquer Formas de Realização, subgrupos, subconjuntos, preferências ou exemplos destes tal como aqui definidos, para utilização num método para: (i) sensibilizar células fúngicas, protozoárias ou de parasita a um fármaco antifúngico, antiprotozoário ou antiparasitário; (ii) aliviar ou reduzir a incidência de resistência a um fármaco antifúngico, antiprotozoário ou antiparasitário; (iii) reverter a resistência a um fármaco antifúngico, antiprotozoário ou antiparasitário; (iv) potenciar a actividade de um fármaco antifúngico, antiprotozoário ou antiparasitário; (v) retardar ou prevenir o surgimento de resistência a um

fármaco antifúngico, antiprotozoário ou antiparasitário, método esse que compreende a administração de uma combinação do composto com o referido fármaco antifúngico, antiprotozoário ou antiparasitário a um sujeito a necessitar deste.

Tal como descrito acima na parte introdutória deste pedido, verificou-se que os compostos possuindo actividade inibidora de Hsp90 exibem potente actividade antifúngica e previnem o desenvolvimento de resistência a antifúngicos e em particular resistência a antifúngicos dependente de Hsp90. Além disso, verificou-se que a inibição da actividade de Hsp90 pode reduzir o desenvolvimento de resistência a fármacos antifúngicos vulgarmente utilizados tais como os azoles. É portanto considerado que os compostos da invenção serão úteis na profilaxia ou no tratamento de uma série de doenças e condições fúngicas e serão também úteis, quando co-administrados com outros fármacos antifúngicos tais como azoles, em aumento da actividade dos fármacos antifúngicos.

A actividade antifúngica dos compostos da presente invenção pode ser avaliada através da determinação da concentração fungistática mínima (inibição) (m.i.c.). Este teste é habitualmente realizado através da preparação de uma série de placas ou tubos contendo um meio nutriente adequado, cada placa ou tubo contendo também uma concentração diferente do composto de teste e depois inoculando o meio com a espécie fúngica. Após um período de incubação, as placas são examinadas visualmente quanto à presença ou ausência de crescimento fúngico. A m.i.c. é a concentração mínima necessária para prevenir o crescimento fúngico.



Os compostos podem ser utilizados em medicina animal (por exemplo no tratamento de mamíferos tais como humanos).

Infecções fúngicas em animais contra as quais o composto da invenção tal como aqui definido pode ser utilizado incluem:

- Micoses superficiais - i.e. infecções fúngicas limitadas às camadas mais externas da pele e do cabelo;
- Micoses cutâneas - i. e. infecções fúngicas que se estendem mais profundamente na epiderme, mas são tipicamente restritas às camadas queratinizadas da pele, do cabelo e das unhas;
- Micoses subcutâneas - i. e. infecções fúngicas envolvendo a derme, tecido subcutâneo, músculo e fáscia;
- Micoses sistêmicas devido a patógenos primários (estes tipicamente originários principalmente nos pulmões e podem espalhar-se para outros sistemas de órgãos); e
- Micoses sistêmicas devido a patógenos oportunistas (infecções de pacientes com deficiências imunitárias, que de outro modo não seriam infectados).

Exemplos particulares de estados de doença fúngica para os quais os compostos da invenção tal como aqui definido podem ser utilizados incluem:

- Infecções por dermatófitos tais como tinea versicolour (uma infecção fúngica superficial da pele), tinea pedis (Pé de Atleta), tinea capitis (infecção fúngica superficial na cabeça), tinea barbae (infecção fúngica de áreas barbudas), tinea corporis (infecção fúngica de áreas de pele lisa).
- Candidíase das Mucosas, tal como candidíase oral, esofagite e candidíase vaginal.
- Candidíase invasiva ou de órgãos profundos (p. ex., fungemia, endocardite, e endoftalmite).

- Infecções criptocóccicas tais como meningite criptocóccica.
- Histoplasmoses.
- Blastomicose, uma infecção fúngica dos pulmões e ocasionalmente da pele.
- Infecções Fúngicas Invasivas (por exemplo Candidíase Invasiva e Aspergilose Invasiva) em pacientes com sistemas imunitários debilitados, tais como pacientes com SIDA (p. ex. pacientes sob tratamento com fármacos anti-SIDA), ou sob tratamento com agentes anticâncer.
- Aspergiloses tais como Aspergilose Broncopulmonar Alérgica.
- Aspergiloma.
- Infecções intertrigo (infecções fúngicas que ocorrem nas dobras da pele, p. ex. entre os dedos dos pés ou dedos da mão, na área das axilas, ou na região da virilha).
- Maduramicose (invasão fúngica do tecido do pé, também conhecido como micetoma).
- Coccidioidomicose.
- Mucormicose.
- Blastomicose
- Geotricose.
- Cromoblastomicose.
- Conidiosporose.
- Histoplasmoses.
- Rinosporidose.
- Nocardiose.
- Para-actinomicose.
- Peniciliose.
- Monoliase.
- Esporotricose.

Infecções fúngicas de particular interesse são a Candidíase e a Aspergilose.

Os compostos do invento têm também actividade antiprotozoária e antiparasitária. A actividade antiprotozoária dos compostos da presente invenção pode ser avaliada através de métodos convencionais, por exemplo através de determinação da concentração mínima de inibição (m.i.c.) ou do nível de inibição de 50% (CI<sub>50</sub>).

Exemplos de doenças ou condições protozoárias e parasitárias para as quais os compostos da invenção podem ser úteis incluem:

- Doença de Chagas ((tripanosomíase) - uma infecção causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*.
- Ascaridíase - uma doença humana causada pelo nemátode parasita *Ascaris lumbricoides*.
- Leishmaniose - uma doença causada por parasitas do género *Leishmania*.
- Toxoplasmose - uma doença parasitária causada pelo protozoário *Toxoplasma gondii*.
- Esquistossomíase (Bilharziose) - uma doença causada pelo parasita *Schistoma mansoni*.
- Tricomoniase - uma doença sexualmente transmissível causada pelo protozoário parasita *Trichomonas vaginalis*.

### **Actividade Antiviral**

Tal como discutido acima nas secções introdutórias deste pedido, a infecção de uma célula hospedeira com ARN/ADN viral resulta numa reorientação substancial da síntese de proteínas celulares na direcção das proteínas virais chave codificadas pelo ácido nucleico virai, e isto dá

frequentemente origem a sobre-regulação de proteínas de choque térmico. Acredita-se que uma das funções da indução de HSP pode ser a de ajudar na estabilização e dobragem dos níveis elevados de proteína "estranha" gerada na preparação para a replicação do vírus e foi demonstrado (Naakagawa *et al.*) que os inibidores da HSP90 podem bloquear a replicação viral. Deste modo, os compostos da invenção podem ser úteis no combate a infecções virais, por exemplo bloqueando ou inibindo a replicação viral.

Portanto, noutro aspecto, a invenção proporciona um composto da invenção tal como aqui definido para utilização na profilaxia ou no tratamento de uma infecção viral (ou doença viral).

Noutros aspectos, a invenção proporciona:

- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para a profilaxia ou o tratamento de uma infecção viral (ou doença viral).
- Um composto da invenção tal como aqui definido, para utilização no bloqueio ou na inibição da replicação viral num organismo hospedeiro (p. ex. um animal tal como um mamífero (p. ex. humano)).
- A utilização de um composto da invenção tal como aqui definido, para o fabrico de um medicamento para utilização no bloqueio ou na inibição da replicação viral num organismo hospedeiro (p. ex. um animal tal como um mamífero (p. ex. humano)).

Exemplos de infecções virais que podem ser tratadas com os compostos da invenção incluem infecções devidas a qualquer um ou mais dos seguintes vírus:

- Picornavírus tais como rinovírus (vírus do resfriado comum), vírus Coxsackie (p. ex. vírus Coxsackie B); e vírus da febre aftosa;
- Vírus de hepatite tais como vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite D (VHD) e vírus da hepatite E (VHE),
- Coronavírus (p. ex. vírus do resfriado comum e vírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS))
- Adenovírus tais como Adenovírus Humanos (uma causa de infecções respiratórias e conjuntivas);
- Astrovírus (uma causa de sintomas semelhantes a gripe);
- Flavivírus tais como o vírus da Febre-amarela;
- Ortomixovírus tais como vírus da gripe (p. ex. vírus da gripe A, B e C);
- Vírus parainfluenza;
- Vírus sincicial respiratório;
- Enterovírus tais como Poliovírus (vírus da poliomielite);
- Paramixovírus tais como o vírus do Sarampo (rubéola), vírus da papeira, vírus sincicial respiratório (RSV) e vírus da cinomose canina (CDV);
- Togavírus tais como vírus da rubéola (Sarampo Alemão) e vírus Sindbis;
- Vírus de herpes, tais como:
  - Vírus Herpes simplex (HSV), por exemplo HSV-1 que causa bolhas de febre (aftas), gengivoestomatite, ceratite do herpes, eczema herpético e encefalite de HSV); e HSV-2 que provoca lesões genitais, infecções neonatais, meningite de HSV, proctite de HSV;
  - Vírus da varicela zoster (VZV), que causa a varicela, síndrome de varicela congénita e zona;
  - Vírus de Epstein-Barr (EBV), que provoca mononucleose infecciosa, linfoma de Burkitt e cancro da nasofaringe;

- Citomegalovírus (CMV), p. ex. citomegalovírus humano (HCMV);
- Vírus do herpes humano 6 (HHV-6), que causa o *exanthum subitum* ou *roséola infantum*
- Vírus do herpes humano 8 (HHV-8) ou vírus de herpes associado ao sarcoma de Kaposi (KSHV), que se verifica na saliva de muitos pacientes com SIDA e associado ao sarcoma de Kaposi;
- *Papovaviridae* tal como o vírus de polioma e o vírus do papiloma humano (HPV);
- Parvovírus;
- Poxvírus tais como o vírus da varíola (vírus da varíola humana);
- Rabdovírus tais como o vírus da raiva e o vírus da estomatite vesicular (VSV); e
- Retrovírus tais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que é responsável pela síndrome de imunodeficiência adquirida (SIDA); e o vírus T-linfotrófico humano (HTLV).

Infecções virais particulares contra as quais os compostos da invenção podem ser utilizados incluem o vírus de herpes, vírus da varíola, vírus de Epstein-Barr, vírus Sindbis, adenovírus, vírus HIV (para prevenção do desenvolvimento de SIDA em indivíduos infectados com HIV), HPV, HCV e HCMV.

A infecção viral pode ser diferente de uma infecção com o vírus da hepatite C (HCV).

A actividade dos compostos da invenção como agentes para bloqueio ou prevenção da replicação viral em organismos hospedeiros ou células hospedeiras pode ser determinada de acordo com procedimentos padrão bem conhecidos dos peritos.

Os compostos da invenção podem ser utilizados como o único agente antiviral ou podem ser utilizados em conjunto com outros agentes antivirais tais como aciclovir, ganciclovir, oseltamavir (Tamiflu®) e zanamavir (Relenza®), amantidina, rimantadina, adefovir-dipivoxilo, interferões (p. ex. interferão alfa-2b e interferão alfa-2a peguilado), lamivudina, entecavir, ribavirina, famciclovir, valciciclovir, valaciclovir, azidotimidina (AZT - Retrovir®), atazanavir, fosamprenavir, lamivudina, lamivudina + abacavir, fumarato de tenofovir-disoproxilo, fumarato de tenofovir-disoproxilo + emtricitabina, tipranavir, nelfinavir, indinavir, raltegravir, ritonavir, lopinavir + ritonavir, darunavir, amprenavir, enfuvirtida, saquinavir, hidroxiureia, VGV-1 e vacinas antivirais.

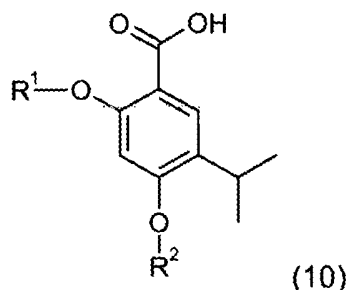
Deste modo, a invenção proporciona ainda:

- Uma combinação de um composto da invenção tal como aqui definido, com um composto auxiliar que é um agente antiviral.
- Uma composição farmacêutica compreendendo um composto da invenção tal como aqui definido, com um composto auxiliar que é um agente antiviral.

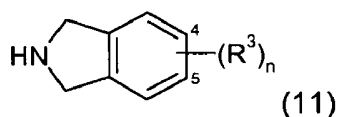
#### **Métodos para a Preparação de Compostos de Fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) e subgrupos destes**

Nesta seção, tal como em todas as outras seções deste pedido, a menos que o contexto indique o contrário, referências às Fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) incluem também todas as formas de realização, subgrupos, subconjuntos destes, excepto se o contexto exigir de outra forma.

Os compostos de fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) podem ser preparados através da reacção de um composto de fórmula (10):



ou um derivado reactivo deste (tal como um cloreto ácido), com um composto de fórmula (11):



sob condições de formação de amida.

Por exemplo, o composto de fórmula (10) pode ser feito reagir com o composto de fórmula (11) na presença de reagentes de acoplamento de amida do tipo vulgarmente utilizado na formação de ligações de amida ou peptídicas. Exemplos de tais reagentes incluem 1,1'-carbonildiimidazol (CDI), 1,3-diciclo-hexilcarbodiimida (DCC) (Sheehan et al., *J. Amer. Soc.* 1955, 77: 1067), 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimida (aqui referido como EDC ou EDAC mas também conhecido na técnica como EDCI e WSCDI) (Sheehan et al., al, *J. Org. Chem.*, 1961, 26: 2525), agentes de acoplamento com base de urónio tais como hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurónio (HATU) e agentes de acoplamento com base em fosfónio tais como hexafluorofosfato de 1-benzotriazoliloxitris-(pirrolidino)fosfónio (PyBOP) (Castro et al., *Tetrahedron Letters*, 1990, 31: 205). Agentes de acoplamento baseados em carbodiimida podem ser vantajosamente usados em combinação com 1-hidroxi-7-



azabenzotriazol (HOAt) (LA Carpino, *J. Amer. Chem. Soc.*, 1993, 115: 4397) ou 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) (Konig et al., *Chem. Ber.*, 103, 708, 2024-2034). Reagentes de acoplamento preferidos incluem EDC (EDAC) e DCC em combinação com HOAt ou HOBt.

Um reagente de acoplamento particular compreende EDC em combinação com HOBt.

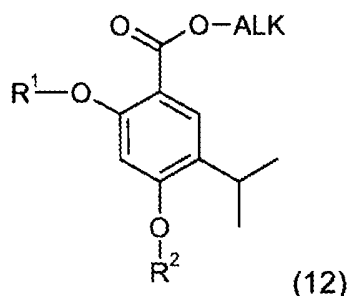
A reacção de acoplamento é tipicamente realizada num solvente não aquoso, não prótico, tal como acetonitrilo, dioxano, dimetilsulfóxido, diclorometano, dimetilformamida ou N-metilpirrolidina, ou num solvente aquoso opcionalmente em conjunto com um ou mais co-solventes miscíveis. A reacção pode ser realizada à temperatura ambiente ou, quando os reagentes são menos reactivos, a uma temperatura apropriadamente elevada, por exemplo uma temperatura de até 100°C, mais tipicamente até cerca de 80°C. A reacção pode ser realizada na presença de uma base não interferente, por exemplo uma amina terciária tal como trietilamina ou *N,N*-diisopropiletilamina.

Alternativamente, o ácido carboxílico (10) pode ser primeiro convertido num derivado reactivo tal como o cloreto ácido e, em seguida, feito reagir com o composto isoindolina de fórmula (11). O cloreto ácido pode ser preparado através de tratamento do ácido carboxílico com cloreto de tionilo, ou através de reacção com cloreto de oxalilo na presença de uma quantidade catalítica de dimetil-formamida, ou através de reacção de um sal de potássio do ácido com cloreto de oxalilo. O cloreto ácido pode então ser feito reagir com o composto de fórmula (11) na presença de uma base não interferente tal como

triethylamina. A reacção pode ser realizada a cerca da temperatura ambiente num solvente polar tal como dioxano.

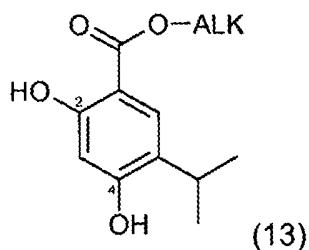
Os compostos da fórmula (11) podem ser preparados através dos métodos descritos em WO 2006/109085 ou métodos análogos a estes.

Os compostos da fórmula (10) podem ser preparados através da hidrólise de um composto éster da fórmula (12):



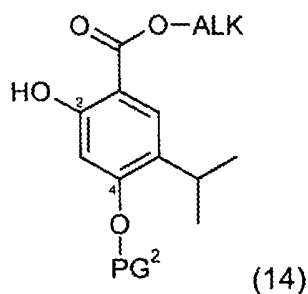
onde ALK é um grupo metilo ou etilo e de preferência um grupo metilo. A hidrólise do éster (12) pode ser realizada usando um hidróxido de metal alcalino tal como hidróxido de potássio ou hidróxido de sódio, em solução aquosa ou solução alcoólica aquosa (p. ex. metanólica). A hidrólise é tipicamente realizada com aquecimento, por exemplo à temperatura de refluxo da solução aquosa.

Os compostos da fórmula (12) podem ser preparados a partir de derivados de resorcinol da fórmula (13):



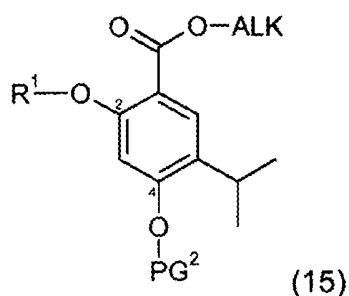
através de várias reacções de alquilação e acilação tal como descrito nos exemplos na secção experimental deste pedido.

Por exemplo, para dar compostos de fórmula (12) em que  $R^1$  é hidrogénio, o grupo 4-hidroxilo no composto de fórmula (13) pode ser selectivamente protegido através de reacção com um composto de fórmula  $PG^2-L^1$  onde  $PG^2$  é um grupo de protecção removível e  $L^1$  é um grupo de saída tal como halogénio na presença de uma base para dar o intermediário (14):



Um grupo de protecção preferido  $PG^2$  é benzilo. A protecção do grupo 4-hidroxilo como um grupo benziloxilo pode ser realizada através da reacção do composto de fórmula (13) com um pouco mais de um equivalente de brometo de benzilo na presença de uma base de carbonato de metal alcalino tal como carbonato de potássio num solvente aprótico polar tal como acetonitrilo. A reacção pode ser realizada à temperatura ambiente. Como alternativa a um grupo de protecção benzilo, o grupo 4-hidroxilo pode ser protegido como um grupo metoximetoxilo através de reacção do composto de fórmula (13) com aproximadamente um equivalente de cloreto de metoximetilo em acetonitrilo na presença de carbonato de potássio.

O composto de fórmula (14) pode então ser feito reagir com um composto de fórmula  $R^2-L^2$  onde  $L^2$  é um grupo de saída tal como um halogénio, ou pode ser feito reagir com um agente de alquilação, para dar um composto de fórmula (15):



A reacção do composto de fórmula (14) pode ser feita reagir com o composto da fórmula  $R^1-L^2$  ou o agente de alquilação na presença de uma base tal como carbonato de potássio num solvente polar aprótico tal como acetonitrilo.

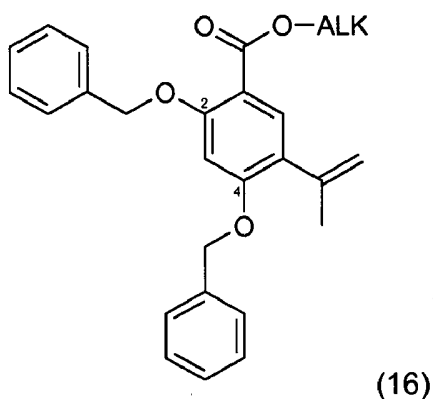
O grupo protector  $PG^2$  pode então ser removido (p. ex. no caso de um grupo benzilo através de hidrogenação sobre paládio em carbono) para dar um composto de fórmula (12) em que  $R^2$  é hidrogénio.

Quando  $PG^2$  é um grupo metoximetilo, pode ser deixado no local (dando assim um composto intermediário (12) em que  $R^1$  e  $R^2$  são diferentes), ou pode ser removido através de reacção com um ácido tal como ácido clorídrico num solvente alcoólico aquoso tal como metanol.

Para se obterem os compostos da fórmula (12) em que  $R^1$  é hidrogénio, um composto de fórmula (13) pode ser feito reagir com aproximadamente um equivalente de um composto de fórmula  $R^2-L^2$  em que  $L^2$  é um grupo de saída tal como um halogénio, ou pode ser feito reagir com aproximadamente um equivalente de um agente de alquilação. A reacção pode ser realizada sob condições análogas às utilizadas acima em ligação com a preparação dos compostos de fórmula (14).

Para preparar compostos da fórmula (12) onde  $R^1 = R^2$  e ambos são diferentes de hidrogénio, um composto de fórmula (13) pode ser feito reagir com aproximadamente dois equivalentes de um composto de fórmula  $R-L^2$  onde  $R = R^1 = R^2$  e  $L^2$  é um grupo de saída tal como um halogénio, ou pode ser feito reagir com aproximadamente um equivalente de um agente de alquilação.

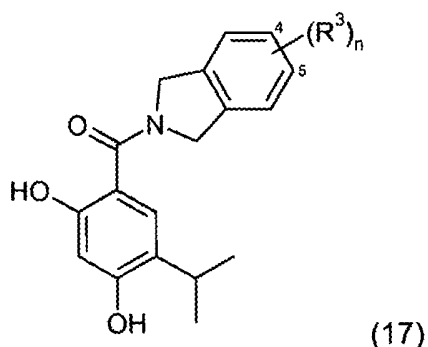
Os Compostos de fórmula (13) podem ser preparados através de hidrogenação de compostos de fórmula (16):



sobre paládio em carbono num solvente alcoólico tal como etanol, metanol ou misturas destes. Os compostos de fórmula (16) podem ser preparados de acordo com o método descrito em WO 2006/109085, ver em particular a Preparação B5 na página 84 de WO 2006/109085.

Os métodos anteriores podem ser particularmente adequados para a preparação de compostos em que  $R^1$  e/ou  $R^2$  são grupos alquilo ou alcenilo opcionalmente substituídos.

Compostos das fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) podem também ser preparados através da reacção de um composto de fórmula (17):



com um reagente ou reagentes adequados para a introdução dos grupos  $R^1$  e/ou  $R^2$ .

Por exemplo, para preparar compostos das fórmulas (1 a), (1 b) e (1 c) onde  $R^1$  e/ou  $R^2$  são  $C(O)NR^4R^5$  onde  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ , ou  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros, o composto de fórmula (17) pode ser feito reagir com um composto de fórmula  $Cl-C(O)NR^4R^5$  num solvente aprótico polar tal como tetra-hidrofurano (THF) na presença de uma base não interferente tal como trietilamina ou N,N-4-dimetilamino-piridina. A reacção pode ser realizada com aquecimento moderado (p. ex. a uma temperatura entre  $50^\circ C$  e  $100^\circ C$ ). Se forem utilizados dois ou mais equivalentes do composto de fórmula  $Cl-C(O)NR^4R^5$ , forma-se o composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) em que ambos de  $R^1$  e  $R^2$  são  $C(O)NR^4R^5$ .

Se desejado, um dos dois grupos  $C(O)NR^4R^5$  pode ser removido através de aquecimento com um hidróxido de metal alcalino tal como um hidróxido de sódio aquoso metanólico para dar uma mistura de regioisómeros de mono-hidroxilo que podem ser separados através de HPLC preparativa. Os compostos mono-hidroxilo resultantes podem então ser tratados com um reagente ou reagentes adequados para introdução de um grupo  $R^1$  ou  $R^2$  diferente. Por exemplo, um composto em que um de  $R^1$  e  $R^2$  é um grupo  $C(O)NR^4R^5$  e o outro é hidrogénio, pode ser

feito reagir com um carbonato de dialquilo de fórmula  $R^6OC(O)OR^6$  (tal como di-*terc*-butil-carbonato) para dar um composto de fórmula (1 a), (1 b) ou (1 c) em que um de  $R^1$  e  $R^2$  é  $C(O)NR^4R^5$  e o outro é  $C(O)OR$  em que  $R^6$  é alquilo  $C_{1-4}$  (p. ex. *terc*-butilo). A reacção com o carbonato de dialquilo é tipicamente realizada num solvente polar aprótico tal como THF na presença de uma base não interferente tal como N,N-4-dimetilaminopiridina, habitualmente com aquecimento, por exemplo até uma temperatura entre 50°C e 100°C.

Compostos em que tanto  $R^1$  como  $R^2$  são  $C(O)OR^6$  podem ser preparados a partir de compostos de fórmula (17) através de reacção com pelo menos dois equivalentes de  $R^6OC(O)OR^6$  sob condições semelhantes ou análogas às descritas acima.

Compostos em que tanto  $R^1$  como  $R^2$  são  $C(O)R^6$  podem ser preparados a partir de compostos de fórmula (17) através de reacção com pelo menos dois equivalentes de  $Cl-C(O)R^6$  num solvente polar aprótico tal como THF na presença de uma base não interferente tal como trietilamina e/ou N,N-4-dimetilaminopiridina. A reacção é tipicamente realizada à temperatura ambiente.

Compostos de fórmula (17) podem ser preparados através dos métodos descritos em WO 2006/109085 (PCT/GB2006/001382), ver em particular Exemplo 36 na página 123, Exemplo 42 na página 125, Exemplo 50 na página 128, Exemplo 55 na página 137, Exemplo 61 na página 143, Exemplo 63 na página 143 e Exemplo 68 na página 145.

Muitos dos procedimentos descritos acima são bem conhecidos dos peritos na técnica, e exemplos de alquilações,

acilações, interconversões de grupos funcionais e reagentes e condições para a realização de tais conversões podem ser verificados em, por exemplo, "Advanced Organic Chemistry", por Jerry March, 4ª edição, 119, Wiley Interscience, New York; "Fiesers' Reagents for Organic Synthesis", Volumes 1-17, John Wiley, editado por Mary Fieser (ISBN: 0-471-58283-2); e "Organic Synthesis", Volumes 1-8, John Wiley, editado por Jeremiah P. Freeman (ISBN: 0-471-31192-8).

Nalgumas das reacções descritas acima, pode ser necessário proteger um ou mais grupos para impedir que a reacção ocorra num local indesejado da molécula. Exemplos de grupos protectores, e métodos de protecção e desprotecção de grupos funcionais, podem ser verificados em "Protective Groups in Organic Synthesis" (T. Green e P. Wuts; 3rd Edition; John Wiley and Sons, 1999).

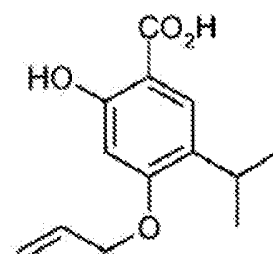
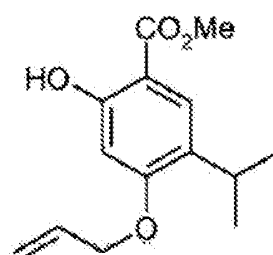
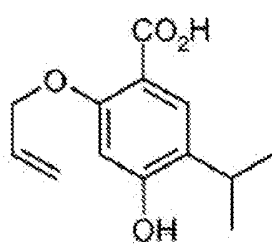
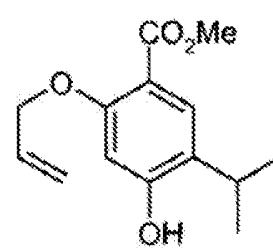
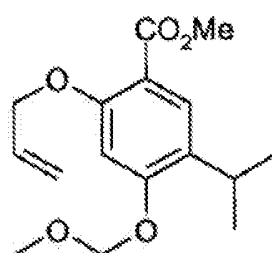
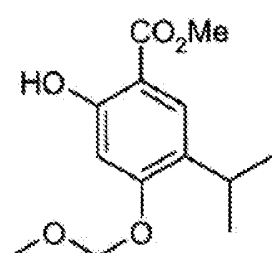
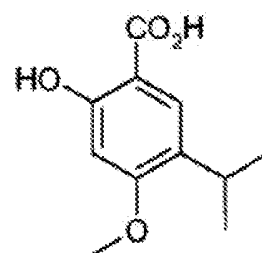
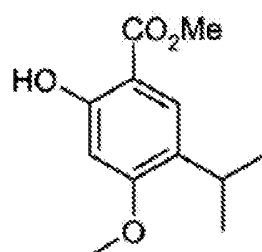
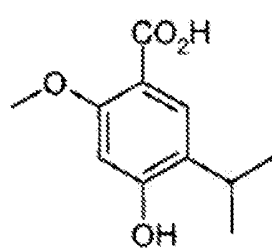
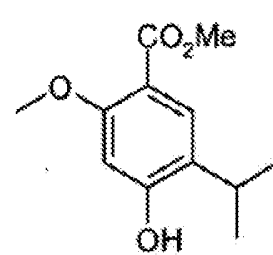
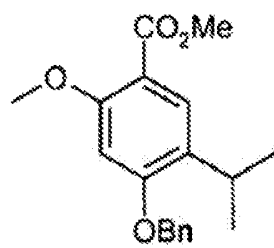
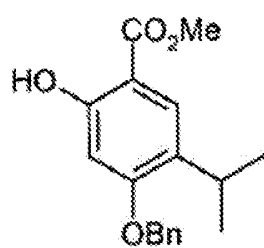
#### Novos Intermediários

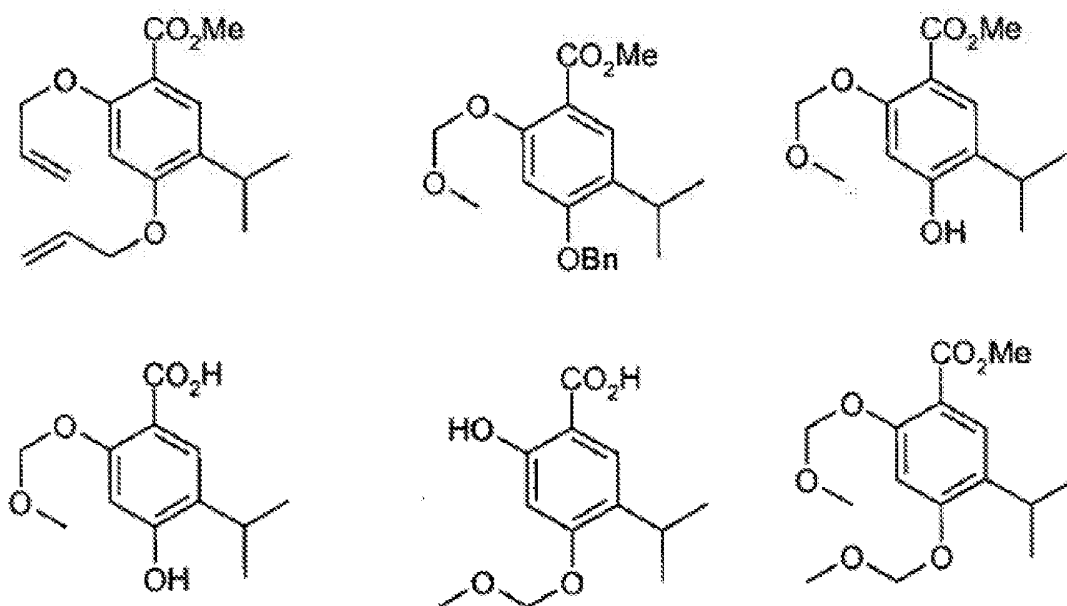
Muitos dos intermediários do processo (10), (12), (14) e (15) são novos.

Deste modo, a invenção divulga também um novo intermediário do processo que é um composto de fórmula (10) ou fórmula (12) ou fórmula (14) ou fórmula (15), tal como aqui definido, mas excluindo os compostos éster de metilo do ácido 2,4-dimetoxi-5-isopropilbenzóico e ácido 2,4-dimetoxi-5-isopropilbenzóico.

Novos compostos intermediários do processo particulares são como expostos abaixo:







### Métodos de Purificação

Os compostos da invenção podem ser isolados e purificados através de vários métodos bem conhecidos dos peritos na técnica e exemplos de tais métodos incluem técnicas cromatográficas tais como cromatografia de coluna (p. ex. cromatografia ultra-rápida) e HPLC. LC-MS preparativa é um método padrão e eficaz usado para a purificação de pequenas moléculas orgânicas tais como os compostos aqui descritos. Os métodos para a cromatografia líquida (LC) e espectrometria de massa (MS) podem ser variados para proporcionar uma melhor separação dos materiais em bruto e uma melhor detecção das amostras através de MS. A otimização do método de LC preparativa em gradiente envolverá colunas diferentes, eluentes voláteis e modificadores, e gradientes. Os métodos são bem conhecidos na técnica para otimização dos métodos de LC-MS preparativa e, em seguida, utilização destes para purificar compostos. Tais métodos são descritos em Rosentreter U, Huber U.; "Optimal fraction collecting in preparative

LC/MS"; *J. Comb. Chem.*; 2004; 6(2): 159-64 e Leister W, Strauss K, Wisnoski D, Zhao Z, Lindsley C., "Development of a custom high-throughput preparative liquid chromatography/mass spectrometer platform for the preparative purification and analytical analysis of compound libraries"; *J. Comb. Chem.*; 2003; 5(3): 322-9.

Alternativamente, métodos baseados em LC preparativa de fase normal podem ser utilizados em vez de métodos de fase inversa. A maioria dos sistemas de LC-MS preparativa utilizam LC de fase inversa e modificadores ácidos voláteis, uma vez que a abordagem é muito eficaz para a purificação de pequenas moléculas e porque os eluentes são compatíveis com espectrometria de massa de electrovaporização de iões positivos. Empregando outras soluções cromatográficas, p. ex. LC de fase normal, alternativamente fase móvel tamponada, modificadores básicos, etc., tal como delineado nos métodos analíticos descritos acima, podem alternativamente ser utilizados para purificar os compostos.

### **Formulações Farmacêuticas**

Embora seja possível que o composto pró-fármaco seja administrado sozinho, é preferível apresentá-lo como uma composição farmacêutica (p. ex. formulação) compreendendo pelo menos um composto activo da invenção, em conjunto com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis (por exemplo transportadores, adjuvantes, diluentes, enchimentos, tampões, estabilizadores, conservantes, lubrificantes, ou outros materiais bem conhecidos dos peritos na técnica) e opcionalmente outros agentes terapêuticos ou profilácticos; por exemplo, agentes que

reduzem ou aliviam alguns dos efeitos secundários associados a quimioterapia. Exemplos particulares de tais agentes incluem agentes antieméticos, agentes que impedem ou diminuem a duração da neutropenia associada à quimioterapia e previnem complicações que surgem a partir de níveis reduzidos de glóbulos vermelhos ou glóbulos brancos, por exemplo eritropoetina (EPO), factor estimulador de colónias de macrófagos-granulócitos (GM-CSF), e factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), e agentes que minimizam a toxicidade gastrointestinal.

Assim, a presente invenção proporciona ainda composições farmacêuticas, tal como definido acima, e métodos de produção de uma composição farmacêutica compreendendo a colocação em associação (p. ex. mistura) de pelo menos um composto activo, tal como definido acima, em conjunto com um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis tais como transportadores, tampões, adjuvantes, estabilizadores, ou outros materiais, tal como aqui descrito.

O termo "excipiente" tal como aqui utilizado refere-se a qualquer componente da composição farmacêutica diferente do composto activo (i.e. no presente caso o composto pró-fármaco).

O termo "farmacêuticamente aceitável" tal como aqui utilizado refere-se a compostos, materiais, composições, e/ou formas de dosagem que são, dentro do âmbito da boa avaliação médica, adequados para utilização em contacto com os tecidos de um sujeito (p. ex. humano) sem excessiva toxicidade, irritação, resposta alérgica, ou outro problema ou complicação, comensurável com uma relação

benefício/risco razoável. Cada excipiente (p. ex., transportador, etc.) deve também ser "aceitável" no sentido de ser compatível com os outros ingredientes da formulação.

Deste modo, num outro aspecto, a invenção proporciona compostos da invenção e subgrupos destes tal como aqui definidos, na forma de composições farmacêuticas.

As composições farmacêuticas podem estar em qualquer forma adequada para administração oral, parentérica, tópica, intranasal, oftálmica, ótica, rectal, intra-vaginal, ou transdérmica. Quando as composições se destinam a administração parentérica, podem ser formuladas para administração intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, subcutânea, ou para distribuição directa num órgão ou tecido alvo através de injeção, infusão ou outros meios de distribuição. A distribuição pode ser através de injeção de bolo, infusão de curto prazo ou infusão de longo prazo e pode ser através de distribuição passiva ou através da utilização de uma bomba de infusão adequada.

Formulações farmacêuticas adaptadas para administração parentérica incluem soluções de injeção estéreis aquosas e não aquosas que podem conter antioxidantes, tampões, bacteriostáticos e solutos que tornam a formulação isotónica com o sangue do receptor pretendido; e suspensões estéreis aquosas e não aquosas que podem incluir agentes de suspensão e agentes espessantes. Exemplos destes estão descritos em R. G. Strickly, "Solubilizing Excipients in oral and injectable formulations", *Pharmaceutical Research*, Vol 21(2) 2004, págs. 201-230. Além disso, podem conter co-solventes, misturas de solventes orgânicos, agentes de complexação de ciclodextrina, agentes emulsionantes (para

formação e estabilização das formulações de emulsão), componentes de lipossomas para formação de lipossomas, polímeros gelificáveis para formação de géis poliméricos, protectores de liofilização e combinações de agentes para, *inter alia*, estabilização do ingrediente activo numa forma solúvel e tornando a formulação isotónica com o sangue do receptor pretendido. As formulações podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou multidose, por exemplo ampolas e frascos selados, e podem ser armazenadas numa condição seca por congelação (liofilizada) requerendo apenas a adição do transportador líquido estéril, por exemplo água para injeções, imediatamente antes da utilização.

Uma molécula de fármaco que seja ionizável pode ser solubilizada na concentração desejada através de ajuste do pH, se a  $pK_a$  do fármaco estiver suficientemente longe do valor de pH da formulação. O intervalo aceitável é pH 2-12 para administração intravenosa e intramuscular, mas subcutaneamente o intervalo é pH 2,7-9,0. O pH da solução é controlado através da forma de sal do fármaco, ácidos/bases fortes, tais como ácido clorídrico ou hidróxido de sódio, ou por soluções de tampões que incluem mas não estão limitadas a soluções tampão formadas a partir de glicina, citrato, acetato, maleato, succinato, histidina, fosfato, tris(hidroximetil)-aminometano (TRIS), ou carbonato.

A combinação de uma solução aquosa e um solvente/tensioactivo orgânico solúvel em água (i.e. um co-solvente) é frequentemente utilizada em formulações injectáveis. Os solventes e tensioactivos orgânicos solúveis em água utilizados em formulações injectáveis incluem, mas não se limitam a, propilenoglicol, etanol,

polietileno glicol 300, polietileno glicol 400, glicerina, dimetilacetamida (DMA), N-metil-2-pirrolidona (NMP; Pharmasolve), dimetilsulfóxido (DMSO), Solutol HS 15, Cremophor EL, Cremophor RH 60, e polissorbato 80. Tais formulações podem ser geralmente, mas não são sempre, diluídas antes da injeção.

Propilenoglicol, PEG 300, etanol, Cremophor EL, Cremophor RH 60, e polissorbato 80 são os solventes e tensioactivos orgânicos totalmente miscíveis em água utilizados em formulações injectáveis comercialmente disponíveis e podem ser usados em combinações uns com os outros. As formulações orgânicas resultantes são geralmente diluídas pelo menos 2 vezes antes da infusão IV em bolo ou IV.

Alternativamente, uma maior solubilidade em água pode ser alcançada através de complexação molecular com ciclodextrinas.

Os lipossomas são vesículas esféricas fechadas compostas de membranas de bicamada lipídica externa e um núcleo aquoso interno e com um diâmetro total de  $<100\text{ }\mu\text{m}$ . Dependendo do nível de hidrofobicidade, fármacos moderadamente hidrófobos podem ser solubilizados por lipossomas se o fármaco se tornar encapsulado ou intercalado dentro do lipossoma. Os fármacos hidrófobos podem também ser solubilizados por lipossomas se a molécula de fármaco se tornar uma parte integrante da membrana de bicamada lipídica e, neste caso, o fármaco hidrófobo é dissolvido na porção lipídica da bicamada lipídica. Uma formulação de lipossoma típica contém água com fosfolípido em 5-20 mg/ml, um isotonicificante, um tampão de pH 5-8, e opcionalmente colesterol.

As formulações podem ser apresentadas em recipientes de dose unitária ou multidoses, por exemplo ampolas seladas, frascos ou seringas pré-carregadas, e podem ser armazenadas numa condição seca por congelação (liofilizada) requerendo apenas a adição do transportador líquido estéril, por exemplo água para injeções, imediatamente antes da utilização.

A formulação farmacêutica pode ser preparada através de liofilização de um composto de Fórmula (I) ou um sal de adição ácida deste. A liofilização refere-se ao procedimento de secagem por congelação de uma composição. A secagem por congelação e a liofilização são portanto aqui utilizados como sinónimos. Um processo típico é solubilizar o composto e a formulação resultante é clarificada, filtrada para esterilização e transferida assepticamente para contentores apropriados para liofilização (p. ex. frascos). No caso de frascos, estes são parcialmente tapados com rolhas de liofilização. A formulação pode ser arrefecida até congelar e sujeita a liofilização sob condições padrão e depois hermeticamente tapada formando uma formulação liofilizada seca, estável. A composição terá tipicamente um teor de água residual baixo, p. ex. menos do que 5%, p. ex. menos do que 1% em peso com base no peso do liofilizado.

A formulação de liofilização pode conter outros excipientes, por exemplo agentes espessantes, agentes de dispersão, tampões, antioxidantes, conservantes e ajustadores de tonicidade. Tampões típicos incluem fosfato, acetato, citrato e glicina. Exemplos de antioxidantes incluem ácido ascórbico, bissulfito de sódio,



metabissulfito de sódio, monotioglicerol, tioureia, hidroxitolueno butilado, hidroxí-anisol butilado, e sais de ácido etilenodiaminotetraacético. Os conservantes podem incluir ácido benzóico e seus sais, ácido sórbico e seus sais, ésteres de alquilo do ácido para-hidroxibenzóico, fenol, clorobutanol, álcool benzílico, timerosal, cloreto de benzalcónio e cloreto de cetilpiridínio. Os tampões anteriormente mencionados, bem como dextrose e cloreto de sódio, podem ser usados para ajuste de tonicidade, se necessário.

Agentes espessantes são geralmente utilizados na tecnologia de liofilização para facilitar o processo e/ou proporcionar volume e/ou integridade mecânica ao bolo liofilizado. Um agente de volume significa um diluente sólido particulado livremente solúvel em água, que quando co-liofilizado com o composto ou sal deste, proporciona um bolo liofilizado fisicamente estável, um processo de secagem por congelação óptimo e reconstituição rápida e completa. O agente de volume pode também ser utilizado para tornar a solução isotónica.

O agente espessante solúvel em água pode ser qualquer um dos materiais sólidos inertes farmacêuticamente aceitáveis, tipicamente utilizados para liofilização. Tais agentes de volume incluem, por exemplo, açúcares tais como glicose, maltose, sacarose e lactose; poliálcoois tais como sorbitol ou manitol; aminoácidos tais como glicina; polímeros tais como polivinilpirrolidina; e polissacáridos tais como dextrano.

A razão do peso do agente de volume para o peso do composto activo está tipicamente dentro do intervalo de cerca de 1 a

cerca de 5, por exemplo de cerca de 1 a cerca de 3, p. ex. no intervalo de cerca de 1 a 2.

Alternativamente, podem ser proporcionados numa forma de solução a partir da qual podem ser concentrados e selados num frasco adequado. A esterilização de formas de dosagem pode ser através de filtração ou através de autoclavagem dos frascos e seus conteúdos em fases apropriadas do processo de formulação. A formulação fornecida pode requerer mais diluição ou preparação antes da distribuição, por exemplo diluição em embalagens de infusão estéreis adequadas.

Soluções e suspensões de injeção extemporânea podem ser preparadas a partir de pós, grânulos e comprimidos estéreis.

Numa forma de realização da invenção, a composição farmacêutica está numa forma adequada para administração i.v., por exemplo através de injeção ou infusão.

Noutra forma de realização, a composição farmacêutica está numa forma adequada para administração subcutânea (s.c.).

Numa forma de realização preferida da invenção, as composições farmacêuticas são adequadas para administração oral.

Formas de dosagem farmacêuticas adequadas para administração oral incluem comprimidos, cápsulas (de invólucro duro ou mole), drageias, pílulas, pastilhas, xaropes, soluções, pós, grânulos, elixires e suspensões,

comprimidos sublinguais, hóstias ou adesivos (tais como adesivos bucais).

Composições farmacêuticas contendo os compostos da invenção podem ser formuladas de acordo com técnicas conhecidas, ver por exemplo, "Remington's Pharmaceutical Sciences", Mack Publishing Company, Easton, PA, EUA.

Assim, as composições de comprimidos podem conter uma dose unitária de composto activo juntamente com um diluente ou transportador inerte, tal como um açúcar ou álcool de açúcar, p. ex. lactose, sacarose, sorbitol ou manitol; e/ou um diluente derivado não açúcar tal como carbonato de sódio, fosfato de cálcio, carbonato de cálcio, ou uma celulose ou derivado desta tal como metilcelulose, etilcelulose, hidroxipropilmetilcelulose, celulose microcristalina (MCC), e amidos tais como amido de milho. Os comprimidos podem também conter ingredientes padrão tais como agentes de ligação e granulação tais como polivinilpirrolidona, desintegrantes (p. ex. polímeros reticulados incháveis tais como carboximetilcelulose reticulada), agentes lubrificantes (p. ex. estearatos), conservantes (p. ex. parabenos), antioxidantes (p. ex. BHT), agentes tampão (por exemplo, tampões fosfato ou citrato), e agentes efervescentes tais como misturas de citrato/bicarbonato. Tais excipientes são bem conhecidos e não necessitam de ser aqui discutidos em detalhe.

As formulações de cápsulas podem ser da variedade de gelatina dura ou de gelatina mole e podem conter o componente activo numa forma sólida, semi-sólida, ou líquida. As cápsulas de gelatina podem ser formadas a

partir de gelatina animal ou sintética ou equivalentes derivados vegetais destes.

As composições farmacêuticas (p. ex. comprimidos ou cápsulas) podem ser concebidas para libertar o fármaco, após contacto com os fluidos do estômago (composições de libertação imediata) ou para libertar de um modo controlado (composições de libertação controlada) ao longo de um período prolongado de tempo ou com uma região específica do tracto GI.

As formas de dosagem sólidas (p. ex. comprimidos, cápsulas, etc.) podem ser revestidas ou não revestidas, mas têm tipicamente um revestimento, por exemplo um revestimento de película de protecção (p. ex. um polímero, cera ou verniz) ou um revestimento de controlo da libertação. O revestimento (p. ex. um polímero de tipo Eudragit<sup>™</sup>) pode ser concebido para libertar o componente activo num local desejado dentro do tracto gastrointestinal. Assim, o revestimento pode ser seleccionado de modo a degradar-se sob certas condições de pH dentro do tracto gastrointestinal, libertando deste modo selectivamente o composto no estômago ou no íleo, duodeno ou cólon. Alternativamente ou adicionalmente, o revestimento pode ser usado como um agente de mascaramento de sabor para mascarar sabores desagradáveis tais como fármacos de sabor amargo. O revestimento pode conter açúcar ou outros agentes que ajudem a mascarar sabores desagradáveis.

Em vez de, ou além de, um revestimento, o fármaco pode ser apresentado numa matriz sólida compreendendo um agente de libertação controlada, por exemplo um agente de retardamento de libertação que pode ser adaptado para

libertar selectivamente o composto sob condições de acidez ou alcalinidade variáveis no tracto gastrointestinal. Alternativamente, o material de matriz ou revestimento retardador de libertação pode tomar a forma de um polímero erodível (p. ex. um polímero de anidrido maleico) que é substancialmente continuamente erodido à medida que a dosagem passa através do tracto gastrointestinal. Como uma outra alternativa, o composto activo pode ser formulado num sistema de distribuição que proporciona controlo osmótico da libertação do composto. Outras formulações de libertação osmótica e de libertação retardada ou libertação sustida podem ser preparadas de acordo com métodos bem conhecidos dos peritos na arte.

As composições farmacêuticas compreendem de aproximadamente 1% a aproximadamente 95%, de preferência de aproximadamente 20% a aproximadamente 90% de ingrediente activo. As composições farmacêuticas de acordo com a invenção podem estar, por exemplo, na forma de dose unitária, tal como na forma de ampolas, frascos, supositórios, drageias, comprimidos ou cápsulas, e em particular na forma de comprimidos e cápsulas.

O perito terá o conhecimento necessário para seleccionar as quantidades apropriadas de ingredientes para utilização nas formulações. Por exemplo, os comprimidos e as cápsulas contêm tipicamente 0-20% de desintegrantes, 0-5% de lubrificantes, 0-5% de auxiliares de fluxo e/ou 0-100% de cargas/ou agentes de volume (dependendo da dose de fármaco). Podem também conter 0-10% de aglomerantes poliméricos, 0-5% de antioxidantes, 0-5% de Pigmentos. Os comprimidos de libertação lenta conteriam, além disso, 0-100% de polímeros (dependendo da dose). As películas de

revestimento do comprimido ou da cápsula contém tipicamente 0-10% de polímeros, 0-3% de pigmentos, e/ou 0-2% de plastificantes.

As formulações parentéricas contém tipicamente 0-20% de tampões, 0-50% de co-solventes e/ou 0-100% de Água para Injeção (WFI) (dependendo da dose e de foi seca por congelação). As formulações para depósitos intramusculares podem também conter 0-100% de óleos.

As composições farmacêuticas para administração oral podem ser obtidas através de combinação do ingrediente activo com transportadores sólidos, se desejado granulando a mistura resultante, e processando a mistura, se desejado ou necessário, após a adição de excipientes apropriados, em comprimidos, núcleos de drageias ou cápsulas. É também possível que sejam incorporadas em transportadores plásticos que permitem que os ingredientes activos se difundam ou sejam libertados em quantidades medidas.

As formulações farmacêuticas podem ser apresentadas a um paciente em "embalagens do paciente" contendo um curso completo de tratamento numa única embalagem, usualmente uma embalagem de bolhas. As embalagens do paciente têm uma vantagem sobre as prescrições tradicionais, em que um farmacêutico divide um fornecimento do paciente de um produto farmacêutico a partir de um fornecimento a granel, em que o paciente ter sempre acesso ao folheto da embalagem contido na embalagem do paciente, normalmente em falta nas prescrições ao paciente. Mostrou-se que a inclusão de um folheto melhora a adesão do paciente às instruções do médico.

Composições para utilização tópica incluem pomadas, cremes, pulverizações, adesivos, géis, gotas de líquido e inserções (por exemplo, inserções intra-oculares). Tais composições podem ser formuladas de acordo com métodos conhecidos.

As composições para administração parentérica são tipicamente apresentadas como soluções aquosas ou oleosas estéreis ou suspensões finas, ou podem ser proporcionadas na forma de pó estéril finamente dividido para constituição extemporaneamente com água estéril para injeção.

Exemplos de formulações para administração rectal ou intra-vaginal incluem pessários e supositórios que podem ser, por exemplo, formados a partir de um material moldável ou em forma de cera, contendo o composto activo. Assim, os supositórios ou pessários de dose unitária podem ser preparados através de mistura do ingrediente activo com um ou mais transportadores sólidos convencionais, por exemplo manteiga de cacau, e moldando a mistura resultante. Outros exemplos de materiais cerosos moldáveis incluem polímeros, tais como polialquilenoglicóis de elevado peso molecular, p. ex. polietilenoglicóis de elevado peso molecular.

Alternativamente, no caso de administração vaginal, a formulação pode ser apresentada como um tampão impregnado com os ingredientes activos e opcionalmente um ou mais excipientes ou diluentes. Outras formulações adequadas para administração rectal e vaginal incluem cremes, géis, espumas, pastas e pulverizações.

Outros exemplos de composições tópicas incluem pensos tais como ligaduras e emplastros adesivos impregnados com ingredientes activos e opcionalmente um ou mais excipientes

ou diluentes. Transportadores que podem ser utilizados incluem, p. ex., álcoois poli-hídricos tais como polietilenoglicóis, propilenoglicol ou glicerol. Excipientes adequados são os conhecidos na técnica como sendo apropriados.

As composições para administração através de inalação podem assumir a forma de composições inaláveis em pó ou pulverizações de líquido ou pó, e podem ser administradas na forma padrão usando dispositivos inaladores de pó ou dispositivos de dispensa de aerossóis. Tais dispositivos são bem conhecidos. Para administração através de inalação, as formulações em pó compreendem tipicamente o composto activo juntamente com um diluente sólido inerte em pó tal como lactose.

Os compostos da invenção serão geralmente apresentados na forma de unidade de dosagem e, como tal, conterão tipicamente composto suficiente para proporcionar um nível desejado de actividade biológica. Por exemplo, uma formulação pode conter de 1 nanograma a 2 gramas de ingrediente activo. Dentro deste intervalo, sub-intervalos particulares do composto são de 1 micrograma a 2 gramas, ou de 1 micrograma a 1 grama, ou de 0,1 miligramas a 2 gramas de ingrediente activo (mais habitualmente de 10 miligramas a 1 grama, p. ex. de 50 miligramas a 500 miligramas), ou de 1 micrograma a 20 miligramas (por exemplo de 1 micrograma a 10 miligramas, p. ex. de 0,1 miligramas a 2 miligramas de ingrediente activo).

Para composições orais, uma forma de dosagem unitária pode conter de 1 miligrama a 2 gramas, mais tipicamente de 10 miligramas a 1 grama, por exemplo de 50 miligramas a 1



grama, p. ex. de 100 miligramas a 1 grama, de composto activo.

O composto activo será administrado a um paciente a necessitar deste (por exemplo um paciente humano ou animal) numa quantidade suficiente para alcançar o efeito terapêutico desejado.

### **Métodos de Tratamento**

É considerado que os compostos da invenção e subgrupos tal como aqui definidos, serão úteis na profilaxia ou no tratamento de uma gama de estados ou condições de doença mediados por proteínas clientes de Hsp90. Exemplos de tais estados e condições de doença são expostos acima.

Uma vantagem dos compostos pró-fármacos da presente invenção é serem oralmente administráveis. Os compostos pró-fármacos da presente invenção preferidos proporcionam maior biodisponibilidade (em comparação com o composto activo original) quando administrados através da via oral.

Os compostos são geralmente administrados a um sujeito a necessitar de tal administração, por exemplo um paciente humano ou animal, de preferência um humano.

Os compostos serão tipicamente administrados em quantidades que são terapêuticamente ou profilacticamente úteis e que em geral não são tóxicas. No entanto, em certas situações (por exemplo no caso de doenças com risco de vida), os benefícios da administração de um composto da invenção podem ultrapassar as desvantagens de quaisquer efeitos tóxicos ou efeitos secundários, caso em que pode ser

considerado desejável administrar os compostos em quantidades que estão associadas a um grau de toxicidade.

Os compostos podem ser administrados durante um período prolongado para manter efeitos terapêuticos benéficos ou podem ser administrados apenas durante um curto período de tempo. Alternativamente, podem ser administrados de uma forma contínua ou de uma forma que proporcione uma dosagem intermitente persistente (p. ex. de uma forma pulsátil).

Uma dose diária típica do composto de fórmula (I) pode estar no intervalo de 100 picogramas a 100 miligramas por quilograma de peso corporal, mais tipicamente de 5 nanogramas a 25 miligramas por quilograma de peso corporal, e mais usualmente de 10 nanogramas a 15 miligramas por quilograma (p. ex. de 10 nanogramas a 10 miligramas, e mais tipicamente de 1 micrograma por quilograma a 20 miligramas por quilograma, por exemplo de 1 micrograma a 10 miligramas por quilograma) por quilograma de peso corporal embora doses mais elevadas ou mais baixas possam ser administradas quando necessário. O composto pode ser administrado numa base diária ou numa base repetida todos os 2, ou 3, ou 4, ou 5, ou 6, ou 7, ou 10 ou 14, ou 21, ou 28 dias, por exemplo.

Num esquema de dosagem particular, será dada a um paciente uma injeção de um composto durante períodos de uma hora a 4 horas diárias durante até dez dias, em particular até dois dias, durante uma semana, a cada duas semanas em três, e o tratamento repetido a um intervalo desejado tal como três a seis semanas, em particular a cada três semanas.

Mais particularmente, pode ser dada a um paciente uma infusão de um composto durante períodos de uma hora por dia, duas vezes por semana durante duas semanas em três semanas e o tratamento repetido a cada três semanas.

Alternativamente, pode ser dada a um paciente uma infusão de um composto durante períodos de uma hora por dia, duas vezes por semana, durante três semanas em quatro semanas e o tratamento repetido a cada quatro semanas.

Noutro esquema de dosagem particular, será dada a um paciente uma infusão de um composto durante períodos de uma hora por dia durante até dez dias, em particular até cinco dias durante uma semana, e o tratamento repetido a um intervalo desejado tal como duas a quatro semanas, em particular a cada três semanas.

Mais particularmente, pode ser dado a um paciente uma infusão de um composto durante períodos de uma hora por dia durante 5 dias e o tratamento repetido a cada três semanas.

Noutro esquema de dosagem particular, é dado a um paciente uma infusão ao longo de 30 minutos a 1 hora, seguida de infusões de manutenção de duração variável, por exemplo de 1 a 5 horas, p. ex. 3 horas.

Num outro esquema de dosagem particular, é dado a um paciente uma infusão contínua durante um período de 12 horas a 5 dias, e em particular uma infusão contínua de 24 horas a 72 horas.

Em última análise, no entanto, a quantidade do composto administrado e o tipo de composição utilizada serão função

da natureza da doença ou condição fisiológica a tratar e estará à discrição do médico.

Os compostos tal como aqui definidos, podem ser administrados como o único agente terapêutico, ou podem ser administrados em terapia de combinação com um ou mais outros compostos para tratamento de um determinado estado de doença, por exemplo uma doença neoplásica tal como um cancro, tal como aqui definido anteriormente.

Exemplos de outros agentes terapêuticos ou tratamentos que podem ser administrados em conjunto (quer simultaneamente quer a intervalos de tempo diferentes) com os compostos da invenção incluem, mas não estão limitados a:

- Inibidores da Topoisomerase I
- Antimetabolitos
- Agentes que se dirigem a tubulina
- Ligadores de ADN e inibidores da topoisomerase II
- Agentes de Alquilação
- Anticorpos Monoclonais
- Anti-Hormonas
- Inibidores da Transdução de Sinal
- Inibidores de Proteossomas
- ADN-metiltransferases
- Citocinas e retinóides
- Terapias dirigidas à cromatina, p. ex. moduladores de HDAC ou HAT
- Radioterapia; e
- Outros agentes terapêuticos ou profiláticos; por exemplo, agentes que reduzem ou aliviam alguns dos efeitos secundários associados a quimioterapia. Exemplos particulares de tais agentes incluem agentes antieméticos, agentes que impedem ou diminuem a duração da neutropenia

associada à quimioterapia e previnem complicações que surgem a partir de níveis reduzidos de glóbulos vermelhos e glóbulos brancos, por exemplo eritropoetina (EPO), factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), e factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF), e agentes que minimizam a toxicidade gastrointestinal associada. Também estão incluídos agentes que inibem a reabsorção óssea tais como agentes de bisfosfonato, p. ex. zoledronato, pamidronato e ibandronato, agentes que suprimem respostas inflamatórias (tais como dexametasona, prednisona e prednisolona) e agentes utilizados para reduzir os níveis sanguíneos de hormona de crescimento e IGF-I em pacientes com acromegalia tais como formas sintéticas da hormona somatostatina do cérebro, que incluem acetato de octreotida que é um octapéptido de acção prolongada com propriedades farmacológicas imitando as da hormona somatostatina natural. Estão ainda incluídos agentes tais como leucovorina, que é utilizada como um antídoto para fármacos que diminuem os níveis de ácido fólico ou do próprio ácido folínico, e agentes tais como acetato de megestrol.

Outros agentes terapêuticos que podem ser administrados em combinação com os compostos pró-fármacos da presente invenção incluem os agentes terapêuticos descritos em PCT/GB2007/003864 (publicação número WO/2008/044029), cuja divulgação é aqui incorporada por referência.

De preferência, outros agentes terapêuticos para utilização nas combinações da invenção são seleccionados a partir das seguintes classes:

1. hormonas, agonistas hormonais, antagonistas hormonais e agentes moduladores de hormonas (incluindo

corticosteróides, anti-androgénios, anti-estrogénios e GNRA);

2. citocinas e agentes de activação de citocinas;

3. retinóides e rexinóides

4. anticorpos monoclonais (incluindo anticorpos monoclonais para antigénio ou antigénios da superfície celular);

5. compostos de camptotecina e outros inibidores da topoisomerase I;

6. antimetabolitos;

7. alcalóides vinca e outros agentes dirigidos à tubulina;

8. taxanos

9. epotilonas;

10. compostos de platina;

11. ligadores de ADN e inibidores da Topo II (incluindo derivados de antraciclina);

12. agentes de alquilação (incluindo os agentes de alquilação aziridina, mostarda de azoto e nitrosourea);

13. inibidores de CDK;

14. inibidores de COX-2;

15. inibidores de HDAC;

16. moduladores selectivos da resposta imunitária;

17. inibidores de ADN-metiltransferases;

18. inibidores de proteossomas;

19. inibidores de Aurora;

20. inibidores de Hsp90 (incluindo inibidores de Hsp90 auxiliares);

21. agentes direccionados para pontos de verificação;

22. inibidores da reparação do ADN

23. inibidores de inibidores e receptores acoplados a proteína G

24. inibidores de sinalização

25. outros agentes terapêuticos ou profiláticos; por exemplo, agentes que reduzem ou aliviam alguns dos efeitos

secundários associados a quimioterapia. Exemplos particulares de tais agentes incluem agentes antieméticos e agentes que previnem ou diminuem a duração da neutropenia associada à quimioterapia e previnem complicações que surgem a partir de níveis reduzidos de glóbulos vermelhos ou glóbulos brancos, por exemplo eritropoetina (EPO), factor estimulador de colónias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), e factor estimulador de colónias de granulócitos (G-CSF). Também estão incluídos agentes que inibem a reabsorção óssea, tais como agentes de bisfosfonato, p. ex. zoledronato, pamidronato e ibandronato, agentes que suprimem respostas inflamatórias (tais como dexametasona, prednisona e prednisolona) e agentes utilizados para reduzir os níveis sanguíneos de hormona de crescimento e IGF-I em pacientes com acromegalia, tais como formas sintéticas da hormona somatostatina do cérebro, que incluem acetato de octreotida, que é um octapéptido de acção prolongada com propriedades farmacológicas imitando as da hormona somatostatina natural. Estão ainda incluídos agentes tais como leucovorina, que é utilizada como um antídoto para fármacos que diminuem os níveis de ácido fólico ou do próprio ácido folínico, e agentes tais como acetato de megestrol.

Neste pedido os "outros agentes terapêuticos" (1) a (24) que podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção podem ser referidos por conveniência como "compostos auxiliares".

As definições, actividades biológicas, preferências, formas de realização específicas e posologias para cada um dos tipos de agente terapêutico (composto auxiliar) (1) a (24) acima são tal como definidos no nosso anterior pedido de

patente Internacional PCT/GB2007/003864 (publicação número WO/2008/044029).

Em formas de realização da invenção em que uma combinação compreende uma ou mais de outros compostos auxiliares, os referidos compostos auxiliares são seleccionados de preferência independentemente a partir das classes (1) (em particular, corticosteróides), (4), (6), (7), (8), (10), (11), (12), (16), (17), (18), (22) e (23). De preferência, o composto ou compostos auxiliares são seleccionados independentemente a partir das classes (1) a (24) (por exemplo classes (1) a (23)) expostas acima. De maior preferência, o um ou mais outros compostos auxiliares são seleccionados independentemente a partir da classe (1) em particular corticosteróides, (4), (6), (8), (10), (11), (12), (17), (18) e (23).

Em formas de realização da invenção em que a combinação compreende dois ou mais compostos auxiliares, então os dois ou mais compostos auxiliares são de preferência seleccionados independentemente a partir das classes (1) a (24) (por exemplo classes (1) a (23)) expostas acima.

Outras formas de realização da invenção em que a combinação compreende dois ou mais compostos auxiliares (para além dos compostos pró-fármacos da invenção) incluem:

- uma combinação de lenolidamida e talidomida;
- uma combinação de duas ou mais das classes anteriores seleccionadas independentemente a partir de (1), de preferência corticosteróides, (12) e (16), de preferência lenolidamida ou talidomida;



- uma combinação de duas ou mais das classes anteriores independentemente seleccionadas a partir de (1), de preferência corticosteróides, (7) e (11);
- uma combinação de duas das classes anteriores (1), de preferência corticosteróides e (18);
- uma combinação de duas das classes anteriores (17) e (22);
- uma combinação de duas das classes anteriores (10) e (22);
- uma combinação de duas ou mais das classes anteriores seleccionadas independentemente a partir de (1), de preferência corticosteróides, (4), (6), (7), (8), (10), (11), (12), (16), (17), (18), (22) e/ou (23);
- uma combinação de duas ou mais das classes anteriores seleccionadas independentemente a partir de (1), de preferência corticosteróides, (4), (6), (8), (10), (11), (12), (17), (18) e/ou (23); e
- uma combinação de duas ou mais das classes anteriores seleccionadas independentemente a partir de (1), de preferência corticosteróides, (11), (12), (16) e/ou (18).

Combinações de um composto pró-fármaco da invenção com agentes de platina, taxol, taxotere, gemcitabina, pemetrexed, mitomicina, ifosfamida, vinorelbina, erlotinib e bevacizumab ou combinações de um composto de fórmula (I) com carboplatina e taxol ou cisplatina e gemcitabina são particularmente adequadas para tratamento de cancro do pulmão de células Não Pequenas.

Combinações de um composto pró-fármaco da invenção com 5-FU, leucovorina e CPT 11 ou uma combinação de um composto de fórmula (I) com 5-FU, leucovorina e oxaliplatina, cada

um com bevacizumab são particularmente adequadas para tratamento de cancro do cólon.

Particularmente adequadas para tratamento de cancro da mama são combinações de um composto pró-fármaco da invenção com (a) anticorpos monoclonais (p. ex. trastuzumab e bevicizamab); (b) anticorpos monoclonais (p. ex. trastuzumab e bevicizamab) e taxanos; e (c) antimetabolitos (p. ex. capecitabina) e inibidores de sinalização (p. ex. lapatinib).

Outras combinações adequadas para tratamento de cancro da mama são combinações de um composto pró-fármaco da invenção com 5-FU, doxorubicina e ciclofosfamida, ou combinações de um pró-fármaco da invenção com doxorubicina e ciclofosfamida, em particular.

Uma combinação particular para utilização em tratamento de cancro da mama de HER2 compreende um composto pró-fármaco da invenção e lapatinib.

Combinações de um composto pró-fármaco da invenção com ciclofosfamida, doxorubicina (hidroxidaunorrubicina), vincristina, rituximab e prednisona são particularmente adequadas para tratamento de linfoma não-Hodgkin (e em particular linfoma não-Hodgkin de grau elevado).

Combinações de um composto pró-fármaco da invenção com ciclofosfamida, vincristina, rituximab e prednisona são particularmente adequadas para tratamento de linfoma não-Hodgkin (e em particular linfoma não-Hodgkin de baixo grau).

Particularmente adequadas para tratamento de mieloma múltiplo são combinações de um composto pró-fármaco da invenção com (a) anticorpos monoclonais (p. ex. aqueles que se dirigem a Interleucina 6); (b) inibidores de proteossomas (p. ex. bortezomib); (c) inibidores de proteossomas e corticosteróides (p. ex. velcade e dexametasona); e (d) corticosteróides, agentes de alquilação e lenolidamida/talidomida (p. ex. prednisolona, melfalano e talidomida).

Combinações específicas adequadas para tratamento de mieloma múltiplo são combinações de um composto pró-fármaco da invenção com vincristina, doxorrubicina, talidomida e dexametasona.

Combinações de um composto pró-fármaco da invenção com fludarabina e rituxamab são particularmente adequadas para tratamento de leucemia linfocítica crónica.

Particularmente adequadas para tratamento de melanoma são combinações de um composto pró-fármaco da invenção com (a) inibidores da ADN-metilase/agentes hipometilantes (p. ex. temozolamida); (b) agentes de alquilação (p. ex. dacarbazina ou fotemustina); e (c) inibidores da ADN-metilase/agentes hipometilantes (p. ex. temozolamida) e inibidores da reparação do ADN/inibidores de PARP.

Particularmente adequadas para tratamento de tumores do estroma gastrointestinal (GIST) são combinações dos compostos pró-fármacos da invenção com um agente auxiliar seleccionado a partir de imatinib, nilotinib, dasatinib e sunitinib.

Particularmente adequadas para tratamento de cancro da próstata são combinações de um composto pró-fármaco da invenção com hormonas e inibidores de receptores acoplados com proteína G.

Particularmente adequadas para tratamento de Cancro do Pulmão de Células Não Pequenas (NSCLC) são combinações de um composto pró-fármaco da invenção com (a) compostos de platina e taxanos; (b) compostos de platina e antimetabolitos; (c) gefitinib e/ou cetuximab.

Uma combinação particular para utilização em tratamento de NSCLC compreende um pró-fármaco da invenção e gefitinib e/ou cetuximab.

Para tratamento de cancro (e em particular leucemia mielóide aguda), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de dois ou mais de antraciclina, Ara C (a.k.a. Citarabina), 6-mercaptopurina, tiopurina, metotrexato, mitoxantrona, daunorrubicina, idarrubicina, gemtuzumab ozogamicina e factores estimuladores de colónias de granulócitos podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção. Alternativamente, os dois ou mais agentes anticancro podem ser seleccionados independentemente a partir de dois ou mais de antraciclina, Ara C (a.k.a. Citarabina), daunorrubicina, idarrubicina, gemtuzumab ozogamicina e factores estimuladores de colónias de granulócitos.

Para tratamento de cancro (e em particular cancro da mama), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de bevacizumab, taxanos,

metotrexato, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, anastrozol, exemestano, letrozol, tamoxifeno, doxorubicina, herceptina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, epirubicina e capecitabina, particularmente 5-FU, metotrexato e ciclofosfamida; 5-FU, doxorubicina e ciclofosfamida; ou doxorubicina e ciclofosfamida podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção. De preferência, para tratamento de cancro (e em particular cancro da mama), os dois ou mais agentes anticancro podem também ser seleccionados independentemente a partir de taxanos, metotrexato, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, anastrozol, exemestano, letrozol, tamoxifeno, doxorubicina, herceptina, 5-fluorouracilo, ciclofosfamida, epirubicina e capecitabina, particularmente 5-FU, metotrexato e ciclofosfamida; 5-FU, doxorubicina e ciclofosfamida; ou doxorubicina e ciclofosfamida.

Para tratamento de cancro (e em particular leucemia linfocítica crónica (CLL)), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de alemtuzumab, clorambucil, ciclofosfamida, almentuzumab, vincristina, prednisolona, fludarabina, mitoxantrona e rituximab/rituxamab, particularmente fludarabina e rituxamab podem ser usados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção. De preferência, para tratamento de cancro (em particular leucemia linfocítica crónica (CLL)), os dois ou mais agentes anticancro são seleccionados independentemente a partir de clorambucil, ciclofosfamida, vincristina, prednisolona, fludarabina, mitoxantrona e rituximab/rituxamab, particularmente fludarabina e rituxamab.

Para tratamento de cancro (e em particular leucemia mielóide crónica (CML)), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de hidroxiureia, citarabina, desatinib, nilotinib e imatinib podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Para cancro (e em particular tratamento de cancro do cólon), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de cetuximab, 5-Fluorouracilo, pantumab, leucovorina, irinotecano, oxaliplatina, raltirexed, capecitabina, bevacizumab, oxaliplatina, CPT 11, particularmente 5-Fluorouracilo, Leucovorina e CPT 11 ou Fluorouracilo, Leucovorina e Oxaliplatina podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Alternativamente, para cancro (e em particular tratamento de cancro do cólon), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de 5-Fluorouracilo, leucovorina, irinotecano, oxaliplatina, raltirexed, capecitabina, bevacizumab, oxaliplatina, CPT 11 e particularmente 5-Fluorouracilo, Leucovorina e CPT 11 ou Fluorouracilo, Leucovorina e Oxaliplatina podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Para cancro (e em particular tratamento de mieloma múltiplo), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de vincristina, doxorubicina, dexametasona, melfalano, prednisona, ciclofosfamida, etopósido, pamidronato, talidomida, zoledronato e bortezomib, particularmente vincristina, doxorubicina e

dexametasona podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Para cancro (e em particular tratamento de linfoma não-Hodgkin), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de ciclofosfamida, doxorubicina/hidroxiclorubicina, vincristina/Onco-TCS (V/O), prednisolona, metotrexato, citarabina, bleomicina, etopósido, rituximab/rituxamab, fludarabina, cisplatina, e ifosfamida, particularmente ciclofosfamida, doxorubicina (hidroxiclorubicina), vincristina e prednisona para NHL de alto grau ou ciclofosfamida, vincristina e prednisona para NHL de baixo grau podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Para tratamento de cancro (e em particular Cancro do Pulmão de Células Não Pequenas (NSCLC)), dois ou mais agentes anticancro podem ser seleccionados independentemente a partir de bevacizumab, gefitinib, erlotinib, cisplatina, carboplatina, mitomicina, vinblastina, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina e vinorelbina, especialmente taxol e carboplatina ou gemcitabina e cisplatina podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Para tratamento de cancro (e em particular cancro do ovário), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de compostos de platina (por exemplo Cisplatina, Carboplatina), doxorubicina, doxorubicina lipossómica, paclitaxel, docetaxel, gemcitabina, melfalano e mitoxantrona podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Para tratamento de cancro (e em particular cancro da próstata), dois ou mais agentes anticancro seleccionados independentemente a partir de mitoxantrona, prednisona, buserelina, goserelina, bicalutamida, nilutamida, flutamida, acetato de ciproterona, megestrol/megestrel, dietilestilboestrol, docetaxel, paclitaxel, ácido zoledrónico, prednisolona e taxotere podem ser utilizados em combinação com os compostos pró-fármacos da invenção.

Numa forma de realização particularmente preferida, o composto pró-fármaco da invenção é administrado em combinação com um ou mais agentes auxiliares seleccionados a partir de cisplatina, bortezomib, erlotinib, paclitaxel, trastuzumab e citarabina.

Para o caso de inibidores de Hsp90 combinados com outras terapias, os dois ou mais tratamentos podem ser dados em esquemas de dosagem individualmente variáveis e através de diferentes vias.

Quando o composto é administrado em terapia de combinação com um, dois, três, quatro ou mais de outros agentes terapêuticos (de preferência um ou dois, de maior preferência um), os compostos podem ser administrados simultaneamente ou sequencialmente. Quando administrados sequencialmente, podem ser administrados em intervalos pouco espaçados (por exemplo ao longo de um período de 5-10 minutos) ou em intervalos mais longos (por exemplo 1, 2, 3, 4 ou mais horas de intervalo, ou ainda separados por períodos mais longos quando necessário), sendo o regime de dosagem exacto compatível com as propriedades do agente ou agentes terapêuticos.



Os compostos da invenção podem também ser administrados em conjunto com tratamentos não quimioterapêuticos tais como radioterapia, terapia fotodinâmica, terapia génica; cirurgia e dietas controladas.

Para utilização em terapia de combinação com outro agente quimioterapêutico, o composto e um, dois, três, quatro ou mais outros agentes terapêuticos podem ser, por exemplo, formulados em conjunto numa forma de dosagem contendo dois, três, quatro ou mais agentes terapêuticos. Em alternativa, os agentes terapêuticos individuais podem ser formulados separadamente e apresentados juntos na forma de um estojo, opcionalmente com instruções para a sua utilização.

Um perito na técnica saberia que através do seu conhecimento geral comum que regimes de dosagem e terapias de combinação utilizar.

Noutros aspectos da invenção, são proporcionados:

- uma combinação (por exemplo para utilização em tratamento de cancro do pulmão de células não pequenas) compreendendo (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona ou um sal farmaceuticamente aceitável deste (p. ex. L-lactato) e gefitinib e/ou cetuximab;
- uma combinação (por exemplo para utilização em tratamento de tumores do estroma gastrointestinal (GIST)) compreendendo (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona ou um sal farmaceuticamente aceitável deste (p. ex. L-lactato) e um agente auxiliar seleccionado a partir de imatinib, nilotinib, dasatinib e sunitinib;

- uma combinação (por exemplo para utilização em tratamento de cancro da mama de HER2) compreendendo (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidroisoindol-2-il]-metanona ou um sal farmaceuticamente aceitável deste (p. ex. L-lactato) e lapatinib; e
- uma combinação (por exemplo para utilização em tratamento de leucemia mielóide aguda) compreendendo (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona ou um sal farmaceuticamente aceitável deste (p. ex. L-lactato) e um agente auxiliar seleccionado a partir de daunorrubicina e idarrubicina.

Regimes de dosagem, formulações e protocolos de administração para as combinações acima compreendendo (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona ou um sal farmaceuticamente aceitável deste (p. ex. L-lactato) podem ser tal como exposto acima em relação aos regimes de dosagem, formulações e protocolos de administração para os compostos pró-fármacos ou tal como exposto em WO2008/044027.

O composto (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona pode ser preparado tal como descrito em WO2006/109085 e o L-lactato e outros sais podem ser preparados tal como descrito em WO2008/044034.

### **Métodos de Diagnóstico**

Antes da administração de um composto, um paciente pode ser triado para determinar se uma doença ou condição da qual o paciente esteja ou possa estar a sofrer é uma que possa ser

susceptível de tratamento com um composto possuindo actividade contra Hsp90.

Por exemplo, uma amostra biológica tomada a partir de um paciente pode ser analisada para determinar se uma condição ou doença, tal como cancro, da qual o paciente esteja ou possa estar a sofrer, é uma que seja caracterizada por uma anormalidade genética ou expressão anormal de proteína que conduza à mutação ou sobre-activação de uma proteína cliente de Hsp90. Exemplos de tais anormalidades que resultam em activação de proteínas clientes de Hsp90 incluem: translocação de Bcr-ABL, duplicação interna de Flt-3, e mutação de Braf ou ErbB2.

Assim, o paciente pode ser submetido a um teste de diagnóstico para detectar uma característica marcadora de sobre-regulação. O termo diagnóstico inclui pesquisa. Por marcador incluímos marcadores genéticos, incluindo, por exemplo, a medição da composição do ADN para identificar mutações de Braf, BCR-abl, e Flt3 ou outras proteínas clientes afectadas. O termo marcador inclui também proteínas, tais como ErbB2, incluindo níveis ou concentrações da proteína ou alguns fragmentos ou produtos de degradação e para enzimas a actividade enzimática. A proteína (p. ex. fosforilada ou não) e os níveis de ARNm das proteínas acima mencionadas podem também ser avaliados para caracterizar uma alteração na actividade. Por exemplo, o nível de AKT fosforilada pode ser um indicador de sensibilidade a inibidores de HSP90. Os testes de diagnóstico são normalmente realizados numa amostra biológica seleccionada a partir de, por exemplo, amostras de biopsia de tumor, amostras de sangue (isolamento e enriquecimento de células tumorais vertidas), biopsias de

fezes, expectoração, análise cromossómica, líquido pleural, líquido peritoneal, lanças ou biopsia bucais ou a partir de urina.

O processo de pesquisa envolverá tipicamente sequenciação directa, análise de *microarrays* de oligonucleótidos ou de proteínas, análise proteómica através de espectrometria de massa, técnicas de imuno-histoquímica ou detecção utilizando um anticorpo específico.

Os métodos de identificação e análise de mutações e sobre-regulação de proteínas são bem conhecidos de um perito na técnica. Os métodos de pesquisa podem incluir, mas não estão limitados a, métodos padrão tais como transcriptase reversa-reacção em cadeia da polimerase (RT-PCR), hibridização *in situ* ou imunotransferência.

Em pesquisa através de RT-PCR, o nível de ARNm no tumor é avaliado através da criação de uma cópia de ADNc do ARNm, seguido por amplificação do ADNc por PCR. Os métodos de amplificação por PCR, a selecção dos iniciadores, e as condições para amplificação, são conhecidos de um perito na técnica. As manipulações de ácidos nucleicos e PCR são realizadas através de métodos padrão, tal como descrito por exemplo em Ausubel, F.M. *et al.*, Eds. "Current Protocols in Molecular Biology", 2004, John Wiley & Sons Inc., ou Innis, M.A. *et al.*, Eds. "PCR Protocols: a guide to methods and applications", 1990, Academic Press, San Diego. Reacções e manipulações envolvendo técnicas de ácido nucleico são também descritas em Sambrook *et al.*, 2001, 3ª Ed., "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press. Alternativamente, pode ser utilizado um estojo disponível comercialmente para RT-PCR

(por exemplo, Roche Molecular Biochemicals), ou metodologia tal como exposta nas patentes dos Estados Unidos 4,666,828; 4,683,202; 4,801,531; 5,192,659, 5,272,057, 5,882,864, e 6,218,529 e aqui incorporadas por referência.

Um exemplo de uma técnica de hibridação *in situ* para avaliação da expressão de ARNm seria hibridação *in situ* de fluorescência (FISH) (ver Angerer, 1987 *Meth. Enzymol.*, 152: 649).

Em geral, a hibridação *in situ* compreende os seguintes passos principais: (1) fixação do tecido a analisar; (2) tratamento de pré-hibridação da amostra para aumentar a acessibilidade do ácido nucleico alvo, e reduzir a ligação não específica; (3) hibridação da mistura de ácidos nucleicos ao ácido nucleico na estrutura biológica ou no tecido; (4) lavagens pós-hibridação para remover fragmentos de ácidos nucleicos não ligados na hibridação; e (5) detecção dos fragmentos de ácido nucleico hibridados. As sondas usadas em tais aplicações são tipicamente marcadas, por exemplo, com isótopos radioactivos ou repórteres fluorescentes. As sondas preferidas são suficientemente longas, por exemplo, de cerca de 50, 100 ou 200 nucleótidos a cerca de 1000 ou mais nucleótidos, para permitir hibridação específica com o ou os ácidos nucleicos alvo, sob condições rigorosas. Também existem sondas de FISH comercialmente disponíveis para detecção citogenética de rearranjos de cromossomas, que podem ser utilizadas para detectar produtos de fusão Bcr-Abl em populações de células de leucemia. Métodos padrão para realização de FISH são descritos em Ausubel, F.M. *et al.*, Eds. "Current Protocols in Molecular Biology", 2004, John Wiley & Sons Inc. e "Fluorescence *In Situ* Hybridization: Technical Overview"

por John M. S. Bartlett em "Molecular Diagnosis of Cancer, Methods and Protocols", 2ª ed.; ISBN: 1-59259-760-2; Março 2004, págs. 077-088; Série: "Methods in Molecular Medicine".

Os métodos para elaboração do perfil de expressão génica são descritos por (DePrimo *et al.*, *BMC Cancer* 2003, 3: 3). Resumidamente, o protocolo é como se segue: ADNc de cadeia dupla é sintetizado a partir de ARN total utilizando um oligómero (dT)24 para iniciação da síntese da primeira cadeia de ADNc, seguido por síntese da segunda cadeia de ADNc com iniciadores de hexâmeros aleatórios. O ADNc de cadeia dupla é utilizado como um molde para transcrição *in vitro* de ARNc utilizando ribonucleótidos biotinilados. O ARNc é quimicamente fragmentado de acordo com protocolos descritos por Affymetrix (Santa Clara, CA, EUA), e, em seguida, hibridado de um dia para o outro em Human Genome Arrays.

Alternativamente, os produtos proteicos expressos a partir dos ARNm podem ser ensaiados através de imuno-histoquímica de amostras de tumores, imunoensaio de fase sólida com placas de microtitulação, transferência Western, electroforese em gel de SDS-poliacrilamida de 2 dimensões, ELISA, citometria de fluxo e outros métodos conhecidos na técnica para detecção de proteínas específicas. Métodos de detecção incluirão o uso de anticorpos específicos do local. O perito reconhecerá todas estas técnicas bem conhecidas para a detecção do "cromossoma Filadélfia" indicativo de translocação bcr-ABL.

Portanto, todas estas técnicas podem também ser utilizadas para identificar tumores particularmente adequados para tratamento com os compostos da invenção.

### **EXEMPLOS**

A invenção será agora ilustrada, mas não limitada, por referência às formas de realização específicas descritas nos seguintes exemplos.

Nos exemplos, podem ser utilizadas as seguintes abreviaturas.

AcOH	ácido acético
BOC	<i>terc</i> -butiloxicarbonilo
Bn	benzilo
CDI	1,1-carbonildiimidazol
DMAW90	Mistura de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H <sub>2</sub> O (90:18:3:2)
DMAW120	Mistura de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H <sub>2</sub> O (120:18:3:2)
DMAW240	Mistura de solventes: DCM: MeOH, AcOH, H <sub>2</sub> O (240:20:3:2)
DCM	diclorometano
DMF	dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EDC	1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)-carbodiimida
Et <sub>3</sub> N	triethylamina
EtOAc	acetato de etilo
Et <sub>2</sub> O	éter dietílico
h	hora(s)
HOAt	1-hidroxiazabenzotriazol

HOBt	1-hidroxibenzotriazol
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
min.	minutos
P.E.	éter de petróleo
TA	temperatura ambiente
SiO <sub>2</sub>	sílica
TBTU	tetrafluoroborato de N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)urónio
THF	tetra-hidrofurano

Espectros de ressonância magnética do protão (<sup>1</sup>H RMN) foram registados num instrumento Bruker AV400 operando a 400,13 MHz, em DMSO-d<sub>6</sub> ou MeOH-d<sub>4</sub> (tal como indicado) a 27°C, salvo indicação em contrário e são relatados como se segue: desvio químico δ/ppm (número de protões, multiplicidade onde s=singlete, d=duplete, t=triplete, q=quarteto, m=multiplete, br=largo). O solvente prótico residual foi utilizado como referência interna.

Nos exemplos, os compostos preparados foram caracterizados através de cromatografia líquida e espectroscopia de massa utilizando o sistema de LC-MS preparativa Agilent e as condições de funcionamento indicadas abaixo. Quando átomos com diferentes isótopos estão presentes e uma única massa é citada, a massa citada para o composto é a massa monoisotópica (i. e. <sup>35</sup>Cl; <sup>79</sup>Br, etc.).

#### Sistema de LC-MS preparativa Agilent 1100:

##### Equipamento:

Amostrador automático: série 1100 "prepALS"



Bomba: série 1100 "PrepPump" para gradiente de fluxo preparativo e série 1100 "QuatPump" para bombear modificador no fluxo de preparação

Detector UV: série 1100 "MWD" Detector de Múltiplos Comprimentos de Onda

Detector MS: série 1100 "LC-MSD VL"

Colector de Fracções: 2 x "Prep-FC"

Bomba de constituição: "Waters RMA"

Splitter

Difusor Activo Agilent

#### Software:

Chemstation: Chem32

#### Condições de operação de MS Agilent:

Tensão capilar:	4000 V (3500 V em ES Negativo)
Fragmentador/Ganho:	150/1
Fluxo de gás de secagem:	13,0 L/min
Temperatura do Gás:	350°C
Pressão do Nebulizador:	50 psig
Faixa de Varrimento:	125-800 amu
Modo de Ionização:	Positivo em ElectroSpray ou Negativo em ElectroSpray

#### Método ácido:

Phenomenex Synergy MAX-RP, 10 µ, 100 × 21,2 mm

Solvente A: H<sub>2</sub>O + ácido trifluoroacético a 0,1%,

Solvente B: CH<sub>3</sub>CN + ácido trifluoroacético a 0,1%

Método básico:

Waters XBridge C18 5  $\mu$  100  $\times$  19 mm

Solvente A: H<sub>2</sub>O + NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> + NH<sub>4</sub>OH 10 mM, pH=9,2

Solvente B: CH<sub>3</sub>CN

Solvente de constituição:

MeOH + Ácido Fórmico a 0,2% (para ambos os tipos de cromatografia)

Métodos:

Para determinar as condições óptimas para HPLC preparativa, LC-MS analítica foi inicialmente realizada utilizando o tipo de cromatografia (de pH alto ou baixo) mais adequado para a estrutura do composto em particular. Uma vez identificado um conjunto de condições que deram a cromatografia, foi escolhido um método de preparação adequado do mesmo tipo. Condições de funcionamento típicas para ambos os métodos de cromatografia de pH baixo e alto foram:

Caudal: 24 mL/min

Gradiente: Geralmente todos os gradientes tinham um passo inicial de 0,4 min com 95% de A + 5% de B. Depois de acordo com o traçado analítico foi escolhido um gradiente de 3,6 min para alcançar uma boa separação (p. ex. de 5% a 50% de B para retenção inicial dos compostos; de 35% a 80% de B, para retenção dos compostos intermédios e assim por diante)

Lavagem: Um passo de lavagem de 1,2 minutos foi realizado no final do gradiente

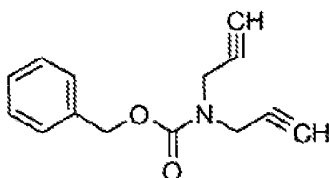
Reequilíbrio: Um passo de reequilíbrio de 2,1 minutos foi realizado para preparar o sistema para a próxima corrida

Fluxo de constituição: 1 mL/min

Solvente:

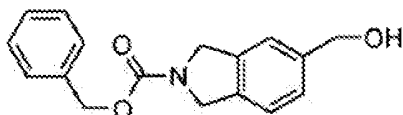
Todos os compostos foram geralmente dissolvidos em MeOH a 100% ou DMSO a 100%.

A partir da informação proporcionada alguém perito na técnica pode purificar os compostos aqui descritos através de LC-MS preparativa.

PREPARAÇÃO DE INTERMEDIÁRIOSPREPARAÇÃO A1Tricloridrato de 5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-2,3-di-hidro-1H-isoindolPasso 1: Éster benzílico do ácido di-prop-2-inil-carbâmico

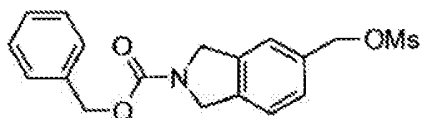
A uma solução arrefecida (0°C) de dipropargilamina (46,7 g, 502 mmol) em EtOAc (200 mL) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso a 10% (700 mL, 507 mmol) foi lentamente adicionada uma solução de N-(benziloxicarboniloxi)succinimida (125 g, 502 mmol) em EtOAc (500 mL) ao longo de 20 mins. A solução foi agitada a 0°C durante 2 h depois à TA 16 h. As fases foram separadas e a fase orgânica foi lavada com K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso a 10% (700 mL, 507 mmol) e em seguida com solução salina saturada (500 mL) e foi diluída para 1000 mL com EtOAc para dar uma solução 0,5 M.

Passo 2: Éster benzílico do ácido 5-hidroximetil-1,3-di-hidro-isoindol-2-carboxílico



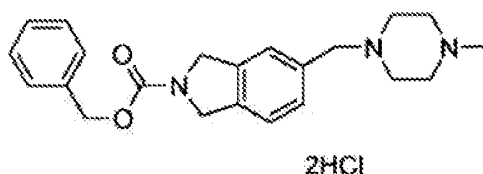
Uma solução de álcool propargílico (26,4 mL, 424 mmol) em tolueno (120 mL) foi desgaseificada. A solução de diino 0,5 M acima (440 mL, 220 mmol) foi evaporada e o resíduo foi dissolvido em tolueno (80 mL). Esta solução de diino protegido e catalisador de Wilkinson (2,26 g, 2,44 mmol) a 1,11% foram adicionados em 14 porções iguais durante um período de 2 h com monitorização constante da temperatura interna de modo a que a temperatura interna se mantivesse a 50-100°C. A solução foi deixada arrefecer até 50°C ao longo de 30 minutos, quando a solução foi evaporada (para remover o excesso de álcool propargílico). O resíduo foi aquecido com tolueno (500 mL) e carvão vegetal (Darco malha 4-12, 20 g) a 100°C durante 30 minutos e depois filtrado a quente através de um leito de Celite e a solução castanha foi evaporada. O resíduo foi dissolvido em EtOAc (400 mL) a 80°C quando foi adicionada sílica-gel (65 g com grau de cromatografia) e o aquecimento continuou durante 20 min. A solução foi filtrada enquanto quente e depois evaporada (com sementeira) para dar um sólido castanho-pálido. EtOAc/heptano a 10% (v/v, 100 mL) foi adicionado e o sólido foi removido através de filtração. O sólido foi lavado no síter com heptano (100 mL) e seco (50°C, bomba de óleo, 16 h) para dar 59,0 g do composto em epígrafe (95%),  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, Me-d<sub>3</sub>-OD): 7,51-7,16 (m, 8H), 5,21 (s, 2H), 4,74 (s, 2H), 4,70 (s, 2H), 4,61 (s, 2H).

Passo 3: Éster benzílico do ácido 5-metanossulfoniloximetil-1,3-di-hidro-isoindol-2-carboxílico



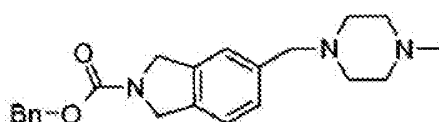
A uma solução de éster benzílico do ácido 5-hidroximetil-1,3-di-hidro-isoindol-2-carboxílico (65,75 g, 0,232 mol) em THF (470 mL) e EtOAc (770 mL) foi adicionado Et<sub>3</sub>N (39 mL, 0,28 mol). A solução foi arrefecida num banho de gelo e foi adicionada uma solução de cloreto de metanossulfonilo (19 mL, 0,245 mol) dissolvida em EtOAc (50 mL) (de modo a que a temp. interna <12°C). Após agitação durante 2 h no banho de gelo foram feitas mais adições de cloreto de metanossulfonilo (1,9 mL e 0,95 mL) e Et<sub>3</sub>N (3,9 mL) (de modo a que através de TLC não houvesse material de partida restante após mais 1 h de agitação). Foi adicionado NaHCO<sub>3</sub> (550 mL) e a solução agitada durante 20 min, depois foi adicionada solução salina saturada (200 mL) e as fases foram separadas. A fase orgânica foi seca (MgSO<sub>4</sub>) e evaporada com sementeira para dar um sólido húmido o qual foi utilizado no passo seguinte sem secagem completa.

Passo 4: Sal dicloridrato do éster benzílico do ácido 5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carboxílico



O sólido do Passo 3 (assume-se 0,232 mol) foi dissolvido em acetona (700 mL) e esta solução foi adicionada ao longo de 45 min a uma suspensão arrefecida (temp. interna 15-17°C) de  $K_2CO_3$  (48 g) e N-metilpiperazina (50 mL, 0,45 mol) em acetona (330 mL). A suspensão foi agitada a 15°C durante 3 h (remoção completa do material de partida através de TLC), quando a solução foi evaporada para um pequeno volume e a partição do resíduo entre EtOAc (1000 mL) e uma mistura de água (500 mL) e solução salina saturada (50 mL). A fase orgânica foi lavada com uma mistura de água (500 mL) e solução salina saturada (150 mL) e finalmente lavou-se com solução salina saturada (300 mL). A solução foi seca ( $MgSO_4$ ) e filtrada e a esta solução foi adicionado HCl 1 M em MeOH (430 mL, 0,43 mol). A suspensão foi arrefecida (0°C durante 30 min) e o sólido removido através de filtração e lavado com EtOAc e depois com heptano no síter e o sólido seco (bomba de óleo, TA 72 h) para dar a colheita 1 de 66,34 g do composto em epígrafe (65%) como um sólido incolor.  $^1H$  RMN (400 MHz, Me- $d_3$ -OD): 7,64-7,51 (m, 2H), 7,51-7,29 (m, 6H), 5,23 (s, 2H), 4,79 (dd,  $J = 16,2, 6,1$  Hz, 4H), 4,49 (s, 2H), 3,66 (s, 8H), 3,03 (s, 3H).

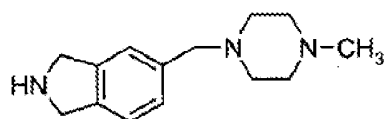
Passo Alternativo: Di-cloridrato do éster benzílico do ácido 4A-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carboxílico



O Passo 4A pode ser utilizado como uma via alternativa para substituir os passos 3 e 4 acima.

A uma suspensão de dióxido de manganês (15,5 g, 178 mmol) em DCM (100 mL) foi adicionado éster benzílico do ácido 5-hidroxi-1,3-di-hidro-isoindol-2-carboxílico (3,35 g, 11,8 mmol) e após 6 h de agitação à TA foi feita outra adição de dióxido de manganês (5 g, 57 mmol). Após mais 1 h de agitação à TA foi adicionado Celite (7 g) e a solução foi filtrada através de um leito de Celite™ dando uma solução amarela pálida límpida. A Celite™ foi lavada com DCM e o volume da solução orgânica combinada ajustado a 100 mL através de evaporação. N-metilpiperazina (1,31 mL, 11,8 mmol) e ácido acético (0,68 mL) foram adicionados, seguido de triacetoxiboro-hidreto de sódio (4,98 g, 23,5 mmol). A solução amarela foi agitada 16 h dando uma solução incolor. À solução foi adicionado HCl 2 M (10 mL, 20 mmol) dando uma efervescência. Após 30 min, água (10 mL) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (5,5 g, 39,8 mmol) foram adicionados e a fase orgânica foi seca (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Após filtração foi adicionado HCl 4M em dioxano (6 mL) com agitação e a suspensão foi evaporada até à secura. O resíduo foi dissolvido em MeOH com aquecimento e, após evaporação, o sólido foi lavado num síter com EtOAc, em seguida, gasolina (p.e. de 40-60°C), seguido de secagem em vácuo a 50°C para dar 3,61 g do composto em epígrafe (70%). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, Me-d<sub>3</sub>-OD): 7,65-7,51 (2H, m), 7,51-7,27 (6H, m), 5,23 (2H, s), 4,83-4,69 (4H, m), 4,49 (2H, s), 3,66 (8H, d), 3,03 (3H, s)

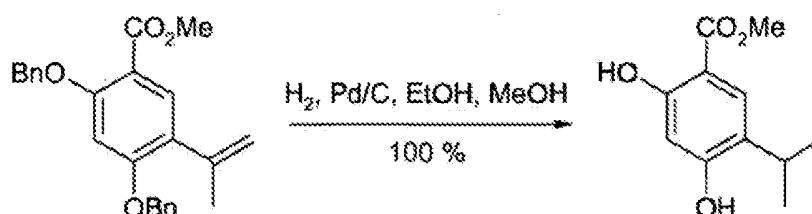
Passo 5: Tricloridrato de 5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-2,3-di-hidro-1H-isoindol



Paládio a 10% em carbono (300 mg) foi adicionado a uma suspensão de 5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carboxilato de benzilo (3,65 g, 10,0 mmol) em metanol (50 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente sob uma atmosfera de hidrogénio durante 5 horas. O catalisador foi removido através de filtração, lavado com metanol (2 × 5 mL) e os filtrados combinados foram tratados com uma solução saturada de gás de cloreto de hidrogénio em acetato de etilo (20 mL). A mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 30 minutos e o material volátil e o solvente foram removidos em vácuo para dar tricloridrato de 5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-2,3-di-hidro-1*H*-isoindol (3,39 g, 99%) como um sólido esbranquiçado.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{MeOH-d}_4$ ) 7,73 (1H, s), 7,68 (1H, d), 7,57 (1H, d), 4,72 (2H, s), 4,70 (2H, s), 4,52 (2H, s), 3,70 (8H, br s), 3,02 (3H, s). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  232.

#### PREPARAÇÃO A2

##### 2,4-Di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo



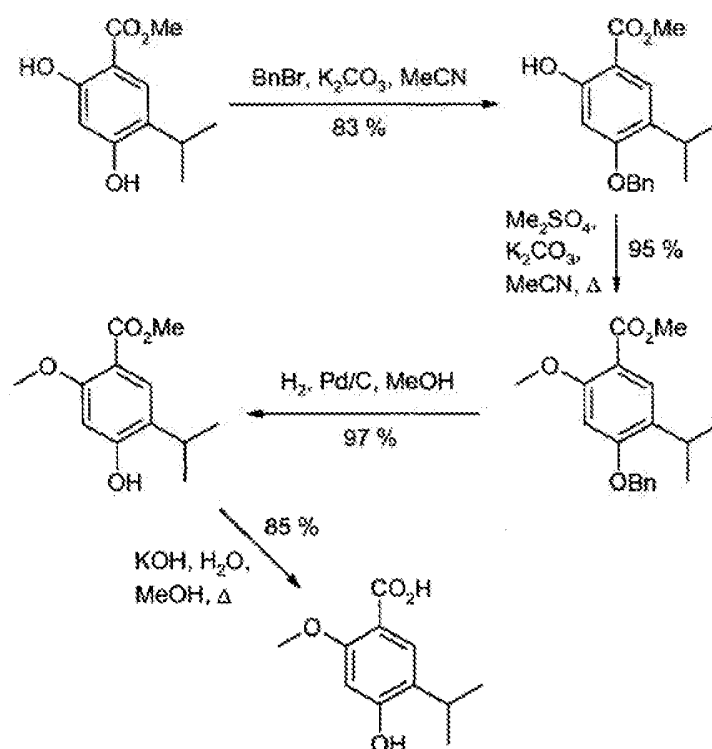
Paládio a 10% em carbono (350 mg) foi adicionado a uma suspensão de 2,4-bis-benziloxi-5-isopropenilbenzoato de metilo [preparado conforme WO 2006/109085 A1] (3,88 g, 10,0 mmol) em etanol (30 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente sob uma atmosfera de hidrogénio



durante 1 hora. Foi adicionado metanol (20 ml) para ajudar à dissolução e a mistura foi agitada à temperatura ambiente sob uma atmosfera de hidrogénio durante 16 horas. A mistura foi filtrada, o catalisador foi lavado com metanol (3 × 20 ml) e os filtrados combinados foram evaporados em vácuo para dar 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (2,10 g, 100%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 10,54 (1 H, s), 10,44 (1 H, br s), 7,52 (1 H, s), 6,37 (1 H, s), 3,85 (3H, s), 3,08 (1 H, m), 1,13 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  211.

### PREPARAÇÃO A3

#### Ácido 4-hidroxi-5-isopropil-2-metoxibenzóico



A mistura de 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (1,05 g, 5,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (828 mg, 6,0 mmol) em acetonitrilo (25 ml) foi tratada com brometo

de benzilo (0,655 ml, 5,5 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo foi tratado com água (50 mL). O material sólido foi colhido através de filtração com sucção, lavado com água (2 × 50 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar 4-benziloxi-2-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (1,25 g, 83%) como agulhas incolores.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 10,68 (1 H, br s), 7,57 (1 H, s), 7,48-7,40 (4H, m), 7,34 (1 H, m), 6,64 (1 H, s), 5,20 (2H, s), 3,87 (3H, s), 3,18 (1 H, m), 1,17 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  301.

Carbonato de potássio anidro (450 mg, 3,26 mmol) e sulfato de dimetilo (0,25 ml, 2,64 mmol) foram adicionados a uma suspensão de 4-benziloxi-2-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (650 mg, 2,17 mmol) em acetonitrilo (20 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 16 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi removido em vácuo e o resíduo foi acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (20 mL). O material orgânico foi extraído com acetato de etilo (2 × 30 mL) e os extractos orgânicos combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar 4-benziloxi-5-isopropil-2-metoxibenzoato de metilo (644 mg, 95%) como um sólido amarelo pálido.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 7,56 (1H, s), 7,50 (2H, d), 7,43 (2H, t), 7,37 (1 H, t), 6,80 (1 H, s), 5,26 (2H, s), 3,83 (3H, s), 3,75 (3H, s), 3,19 (1 H, m), 1,17 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  315.

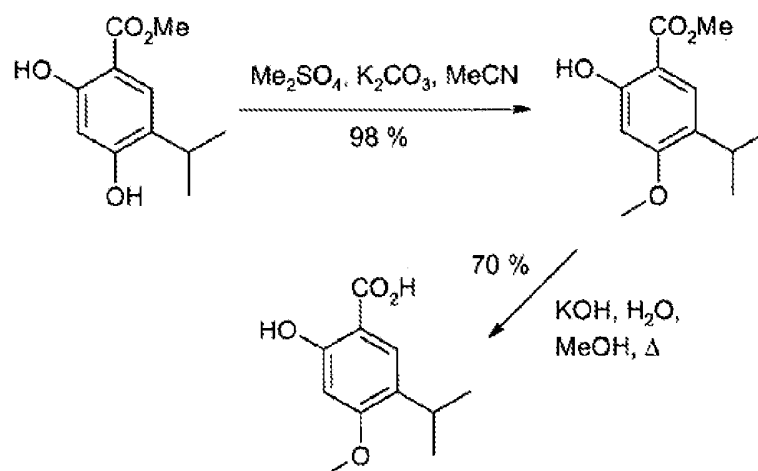
Paládio a 10% em carbono (80 mg) foi adicionado a uma suspensão de 4-benziloxi-5-isopropil-2-metoxibenzoato de metilo (624 mg, 1,99 mmol) em metanol (16 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente sob uma atmosfera de hidrogénio durante 3 horas. A mistura foi filtrada, o

catalisador foi lavado com metanol (3 × 5 mL) e os filtrados combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar 4-hidroxi-5-isopropil-2-metoxibenzoato de metilo (432 mg, 97%) como um sólido esbranquiçado.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 10,18 (1 H, br s), 7,52 (1 H, s), 6,52 (1H, s), 3,73 (3H, s), 3,71 (3H, s), 3,11 (1 H, m), 1,14 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  247.

Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 0,5 mL) foi adicionado a uma suspensão de 2-hidroxi-5-isopropil-4-metoxibenzoato de metilo (418 mg, 1,87 mmol) em metanol (4 mL) e água (2 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 4 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo foi acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 10 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar ácido 4-hidroxi-5-isopropil-2-metoxibenzóico (332 mg, 85%) como um sólido esbranquiçado.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 11,88 (1 H, br s), 10,11 (1 H, s), 7,54 (1 H, s), 6,51 (1 H, s), 3,75 (3H, s), 3,11 (1H, m), 1,13 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  233.

#### PREPARAÇÃO A4

##### Ácido 2-hidroxi-5-isopropil-4-metoxibenzóico



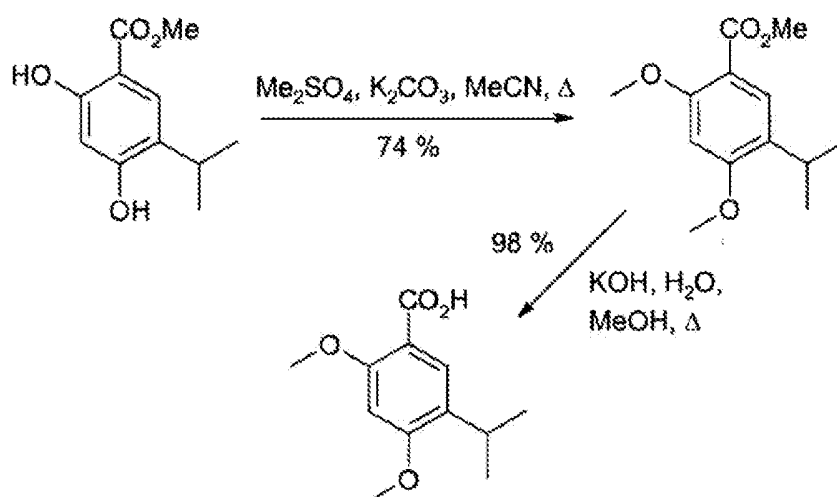
Uma mistura de 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (420 mg, 2,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (331 mg, 2,4 mmol) em acetonitrilo (10 mL) foi tratada com sulfato de dimetilo (0,2 mL, 2,1 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 10 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar 2-hidroxi-5-isopropil-4-metoxibenzoato de metilo (440 mg, 98%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 10,70 (1 H, br s), 7,54 (1 H, s), 6,53 (1 H, s), 3,87 (3H, s), 3,84 (3H, s), 3,12 (1 H, m), 1,13 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  225.

Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 0,2 mL) foi adicionado a uma suspensão de 2-hidroxi-5-isopropil-4-metoxibenzoato de metilo (420 mg, 1,88 mmol) em metanol (5 mL) e água (2 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 3 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2

M (10 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 10 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar ácido 2-hidroxi-5-isopropil-4-metoxibenzóico (275 mg, 70%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 13,50 (1 H, br s), 11,40 (1 H, br s), 7,53 (1 H, s), 6,51 (1 H, s), 3,83 (3H, s), 3,12 (1 H, m), 1,13 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  211.

#### PREPARAÇÃO A5

##### Ácido 5-isopropil-2,4-dimetoxibenzóico



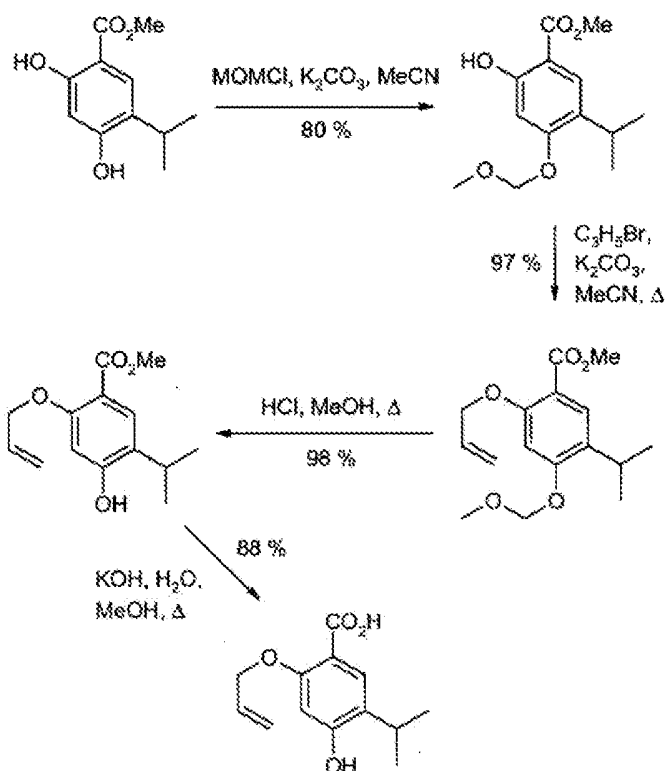
Uma mistura de 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (420 mg, 2,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (662 mg, 4,8 mmol) em acetonitrilo (10 mL) foi tratado com sulfato de dimetilo (0,4 mL, 4,2 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas e depois mantida em refluxo durante 6 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente, o solvente foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 10 mL) e seco por sucção sob

pressão reduzida para proporcionar 5-isopropil-2,4-dimetoxibenzoato de metilo (350 mg, 74%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 7,53 (1 H, s), 6,67 (1 H, s), 3,92 (3H, s), 3,86 (3H, s), 3,75 (3H, s), 3,13 (1 H, m), 1,14 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  261.

Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 0,2 mL) foi adicionado a uma suspensão de 5-isopropil-2,4-dimetoxibenzoato de metilo (330 mg, 1,39 mmol) em metanol (5 mL) e água (2 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 3 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material orgânico foi extraído com acetato de etilo ( $2 \times 30$  mL) e os extractos orgânicos combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar ácido 5-isopropil-2,4-dimetoxibenzóico (305 mg, 98%) como um sólido esbranquiçado.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 12,07 (1 H, br s), 7,57 (1 H, s), 6,64 (1 H, s), 3,90 (3H, s), 3,85 (3H, s), 3,13 (1H, m), 1,14 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  225.

#### PREPARAÇÃO A6

#### Ácido 2-aliloxi-4-hidroxi-5-isopropilbenzóico



Uma mistura de 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (1,05 g, 5,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (828 mg, 6,0 mmol) em acetonitrilo (25 mL) foi tratada com éter metílico de clorometilo (0,4 mL, 5,27 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 3 horas. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo tratado com água (30 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 20 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar 2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)benzoato de metilo (1,02 g, 80%) como um sólido incolor.  $^1H$  RMN ( $DMSO-d_6$ ) 10,61 (1 H, br s), 7,58 (1 H, s), 6,62 (1 H, s), 5,30 (2H, s), 3,88 (3H, s), 3,42 (3H, s), 3,17 (1H, m), 1,17 (6H, d). MS:  $[M+H]^+$  255.

Uma mistura de 2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)benzoato de metilo (995 mg, 3,92 mmol) e carbonato de potássio anidro (650 mg, 4,71 mmol) em

acetonitrilo (25 mL) foi tratada com brometo de alilo (0,356 mL, 4,11 mmol) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 16 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente foi removido em vácuo, foi adicionada água (30 mL) e o material orgânico foi extraído com diclorometano (2 × 30 mL). Os extractos orgânicos combinados foram evaporados até à secura em vácuo para proporcionar

2-aliloxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)benzoato de metilo (1125 mg, 97%) como um óleo amarelo pálido.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 7,58 (1H, s), 6,78 (1H, s), 6,03 (1H, m), 5,52 (1 H, dm), 5,33 (2H, s), 5,28 (1 H, dm), 4,61 (2H, m), 3,78 (3H, s), 3,42 (3H, s), 3,19 (1 H, m), 1,18 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  317.

Ácido clorídrico concentrado (0,4 mL) foi adicionado a uma solução de 2-aliloxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)benzoato de metilo (1049 mg, 3,57 mmol) em metanol (25 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 3 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o material volátil e o solvente foram removidos em vácuo para proporcionar 2-aliloxi-4-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (880 mg, 98%) como um óleo verde pálido.  $^1\text{H}$  RMN (DMSO- $d_6$ ) 10,18 (1H, s), 7,54 (1H, s), 6,51 (1H, s), 6,03 (1H, m), 5,51 (1H, dm), 5,27 (1H, dm), 4,52 (2H, m), 3,73 (3H, s), 3,10 (1H, m), 1,15 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  273.

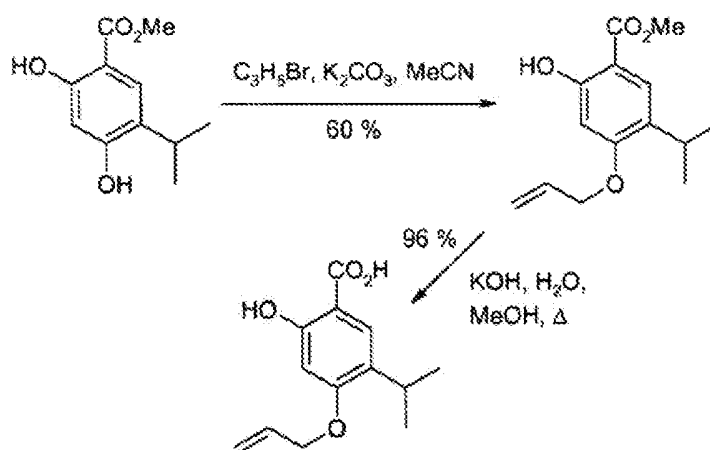
Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 2 mL) foi adicionado a uma mistura de 2-aliloxi-4-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (860 mg, 3,44 mmol) em metanol (12 mL) e água (4 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 5 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (30 mL). O



material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 20 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar ácido 2-aliloxi-4-hidroxi-5-isopropilbenzóico (715 mg, 88%) como um sólido verde pálido.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 11,92 (1 H, br s), 10,08 (1 H, s), 7,56 (1 H, s), 6,48 (1 H, s), 6,03 (1 H, m), 5,50 (1 H, dm), 5,27 (1 H, dm), 4,53 (2H, m), 3,11 (1 H, m), 1,13 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  259.

#### PREPARAÇÃO A7

##### Ácido 4-aliloxi-2-hidroxi-5-isopropilbenzóico



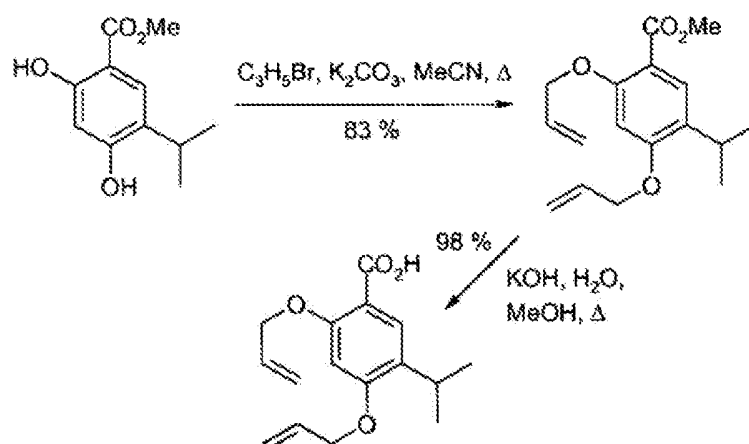
Uma mistura de 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (420 mg, 2,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (662 mg, 4,8 mmol) em acetonitrilo (10 mL) foi tratado com brometo de alilo (0,35 mL, 4,0 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 24 horas. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material orgânico foi extraído com diclorometano (2 × 20 mL), os extractos orgânicos combinados foram evaporados em vácuo e o resíduo foi submetido a cromatografia de coluna em sílica. A

eluição com 2-10% de acetato de etilo em éter de petróleo proporcionou 4-aliloxi-2-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (330 mg, 60%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 10,68 (1 H, s), 7,55 (1 H, s), 6,54 (1 H, s), 6,06 (1 H, m), 5,42 (1 H, dm), 5,29 (1 H, dm), 4,65 (2H, m), 3,88 (3H, s), 3,16 (1 H, m), 1,16 (6H, d).

Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 0,2 mL) foi adicionado a uma suspensão de 4-aliloxi-2-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (313 mg, 1,25 mmol) em metanol (6 mL) e água (2 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 4 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 10 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar ácido 4-aliloxi-2-hidroxi-5-isopropilbenzóico (285 mg, 96%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO}-d_6$ ) 13,50 (1 H, br s), 11,40 (1 H, s), 7,55 (1 H, s), 6,51 (1 H, s), 6,06 (1 H, m), 5,42 (1 H, dm), 5,28 (1 H, dm), 4,64 (2H, m), 3,17 (1 H, m), 1,17 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  237.

#### PREPARAÇÃO A8

##### Ácido 2,4-bis-aliloxi-5-isopropilbenzóico



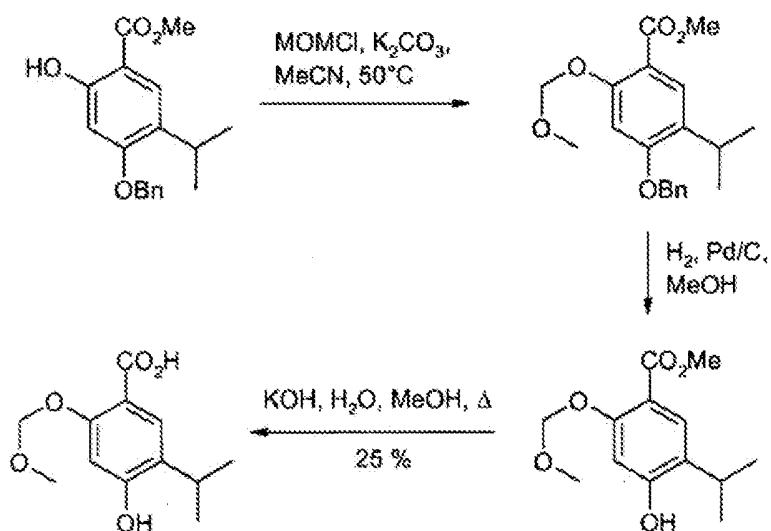
Uma mistura de 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (420 mg, 2,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (662 mg, 4,8 mmol) em acetonitrilo (10 mL) foi tratada com brometo de alilo (0,364 mL, 4,2 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas. Outra porção de brometo de alilo (0,364 mL, 4,2 mmol) foi adicionada e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante mais 16 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (20 mL). O material orgânico foi extraído com acetato de etilo (2 × 20 mL) e os extractos orgânicos combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar 2,4-bis-aliloxi-5-isopropilbenzoato de metilo (480 mg, 83%) como um óleo amarelo pálido.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 7,56 (1 H, s), 6,68 (1 H, s), 6,07 (2H, m), 5,51 (1 H, dm), 5,44 (1 H, dm), 5,28 (2H, m), 4,68 (2H, m), 4,64 (2H, m), 3,75 (3H, s), 3,18 (1H, m), 1,16 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  313.

Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 0,5 mL) foi adicionado a uma mistura de 2,4-bis-aliloxi-5-isopropilbenzoato de metilo (450 mg, 1,55 mmol) em metanol (6 mL) e água (2 mL) e a mistura foi agitada e mantida em

refluxo durante 3 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 10 mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar ácido 2,4-bis-aliloxi-5-isopropilbenzóico (418 mg, 98%) como um sólido esbranquiçado.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 12,16 (1 H, br s), 7,58 (1 H, s), 6,66 (1 H, s), 6,07 (2H, m), 5,51 (1 H, dm), 5,44 (1H, dm), 5,28 (2H, m), 4,68 (2H, m), 4,64 (2H, m), 3,17 (1 H, m), 1,15 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  299.

#### PREPARAÇÃO A9

##### Ácido 4-hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)benzóico



Uma mistura de 4-benziloxi-2-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (900 mg, 3,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (994 mg, 7,2 mmol) em acetonitrilo (20 mL) foi tratada com éter metílico de clorometilo (0,24 mL, 6,6 mmol) e a mistura foi agitada e mantida a  $50^\circ\text{C}$  durante 24 horas após

as quais mais carbonato de potássio anidro (994 mg, 7,2 mmol) e éter metílico de clorometilo (0,96 mL, 26,4 mmol) foram adicionados e a mistura foi agitada e mantida a 50°C durante mais 4 dias. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente foi removido em vácuo e o resíduo tratado com água (30 mL). O material orgânico foi extraído com diclorometano (2 × 20 mL) e os extractos orgânicos combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar 4-benziloxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)benzoato de metilo bruto como um óleo amarelo pálido que foi utilizado no passo seguinte sem purificação adicional. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 7,57 (1 H, s), 7,48 (2H, d), 7,44 (2H, t), 7,38 (1 H, t), 6,90 (1 H, s), 5,23 (4H, s), 3,78 (3H, s), 3,39 (3H, s), 3,21 (1 H, m), 1,17 (6H, d). MS: [M+Na]<sup>+</sup> 367.

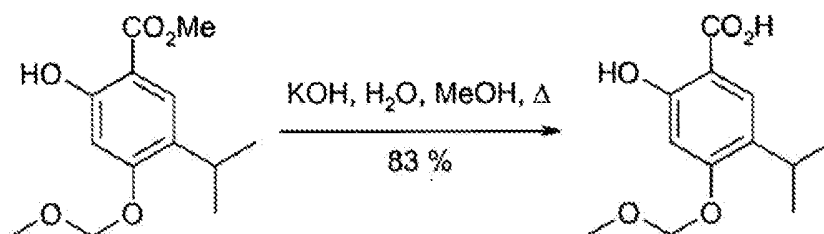
O 4-benziloxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)benzoato de metilo bruto foi dissolvido em metanol (20 mL), foi adicionado paládio a 10% em carbono (160 mg) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente sob uma atmosfera de hidrogénio durante 16 horas. A mistura foi filtrada, o catalisador foi lavado com metanol (3 × 5 mL) e os filtrados combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar 4-hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)benzoato de metilo bruto como um sólido oleoso incolor que foi utilizado no passo seguinte sem purificação adicional. <sup>1</sup>H RMN (DMSO-d<sub>6</sub>) 10,19 (1 H, br s), 7,52 (1 H, s), 6,57 (1 H, s), 5,13 (2H, s), 3,73 (3H, s), 3,40 (3H, s), 3,11 (1 H, m), 1,13 (6H, d). MS: [M-H]<sup>-</sup> 253.

O 4-hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)benzoato de metilo bruto foi dissolvido em metanol (20 mL) e foi adicionada água (8 mL) e hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 5 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo

durante 16 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (30 mL). O material orgânico foi extraído com acetato de etilo (2 × 20 mL) e os extractos orgânicos combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar um óleo amarelo que foi submetido a cromatografia de coluna num cartucho Strata-NH2. A eluição com amónia 2 M em metanol proporcionou ácido 4-hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)benzóico (180 mg, 25%) como um sólido cinzento pálido que foi utilizado sem purificação adicional. MS:  $[M+Na]^+$  263.

#### PREPARAÇÃO A10

##### Ácido 2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)benzóico

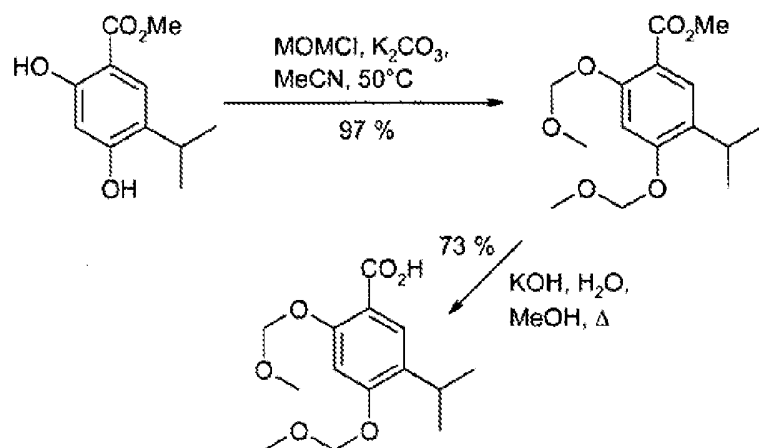


Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 1 mL) foi adicionado a uma mistura de 2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)benzoato de metilo (508 mg, 2,0 mmol) em metanol (10 mL) e água (4 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 6 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (30 mL). O material sólido foi colhido através de filtração por sucção, lavado com água (2 × 20

mL) e seco por sucção sob pressão reduzida para proporcionar ácido 2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)benzóico (400 mg, 83%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 13,60 (1 H, br s), 11,30 (1 H, br s), 7,58 (1 H, s), 6,58 (1 H, s), 5,30 (2H, s), 3,42 (3H, s), 3,15 (1 H, m), 1,18 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{H}]^+$  241.

### PREPARAÇÃO A11

#### Ácido 2,4-bis-(metoximetiloxi)-5-isopropilbenzóico



Uma mistura de 2,4-di-hidroxi-5-isopropilbenzoato de metilo (420 mg, 2,0 mmol) e carbonato de potássio anidro (332 mg, 2,4 mmol) em acetonitrilo (12 mL) foi tratada com éter metílico de clorometilo (0,16 mL, 2,1 mmol) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente durante 16 horas após as quais foi adicionado mais carbonato de potássio anidro (1,38 g, 10,0 mmol) e éter metílico de clorometilo (0,76 mL, 10,0 mmol) e a mistura foi agitada e mantida a  $50^\circ\text{C}$  durante mais 4 dias. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente foi removido em vácuo e o resíduo tratado com água (30 mL). O material orgânico foi extraído com diclorometano (2 × 20 mL) e os extractos orgânicos

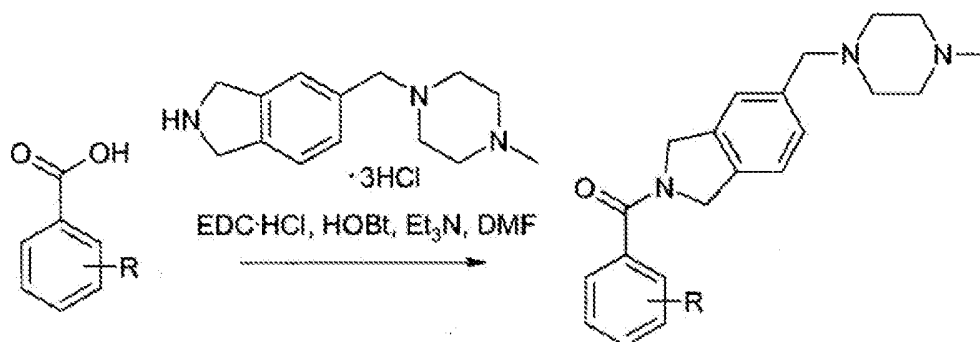
combinados foram evaporados em vácuo para proporcionar 2,4-bis-(metoximetiloxi)-5-isopropilbenzoato de metilo (580 mg, 97%) como um óleo amarelo pálido.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 7,57 (1 H, s), 6,88 (1 H, s), 5,32 (2H, s), 5,20 (2H, s), 3,78 (3H, s), 3,41 (6H, s), 3,21 (1 H, m), 1,17 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  321.

Hidróxido de potássio aquoso (50% p/v, 1,0 mL) foi adicionado a uma mistura de 2,4-bis-(metoximetiloxi)-5-isopropilbenzoato de metilo (560 mg, 1,88 mmol) em metanol (12 mL) e água (4 mL) e a mistura foi agitada e mantida em refluxo durante 3 horas. Após arrefecimento à temperatura ambiente o solvente orgânico foi removido em vácuo e o resíduo diluído com água (20 mL) e acidificado através da adição de ácido clorídrico 2 M (10 mL). O material orgânico foi extraído com diclorometano (2 × 20 mL) e os extractos orgânicos combinados foram evaporados em vácuo. O resíduo foi triturado com uma mistura de éter de petróleo e éter dietílico para proporcionar ácido 2,4-bis-(metoximetiloxi)-5-isopropilbenzóico (392 mg, 73%) como um sólido incolor.  $^1\text{H}$  RMN ( $\text{DMSO-d}_6$ ) 12,38 (1 H, br s), 7,59 (1 H, s), 6,84 (1 H, s), 5,31 (2H, s), 5,20 (2H, s), 3,41 (6H, s), 3,21 (1 H, m), 1,18 (6H, d). MS:  $[\text{M}+\text{Na}]^+$  307.

#### PREPARAÇÃO B1

Método geral para a síntese de 5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-2,3-di-hidro-1*H*-isoindoles substituídos com *N*-benzoílo

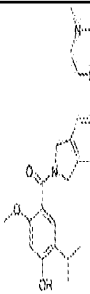

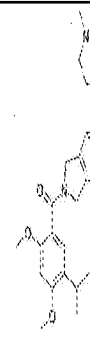



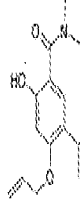






Tricloridrato de 5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-2,3-dihidro-1H-isoindol (409 mg, 1,2 mmol) foi adicionado a uma mistura de ácido benzóico substituído (1,0 mmol), cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida (211 mg, 1,1 mmol), 1-hidroxibenzotriazol (149 mg, 1,1 mmol) e trietilamina (606 mg, 6,0 mmol) em *N,N*-dimetilformamida (8 mL) e a mistura foi agitada à temperatura ambiente ou a 50-80°C durante 16 horas. O solvente foi removido em vácuo e o resíduo tratado com hidrogenocarbonato de sódio aquoso e metanol. O solvente orgânico foi removido em vácuo e a camada aquosa foi removida através de decantação. Os resíduos oleosos escuros foram submetidos a cromatografia de coluna em sílica. A eluição com 5-10% de metanol em diclorometano proporcionou o correspondente 5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-2,3-dihidro-1H-isoindol substituído com *N*-benzoílo. Se necessário, os compostos eram melhor purificados através de cromatografia de coluna num cartucho SCX eluindo com amônia 2 M em metanol.

#### EXEMPLOS 1 A 9

Seguindo o método geral descrito acima, foram preparados os compostos dos Exemplos 1 a 9 expostos na Tabela abaixo.

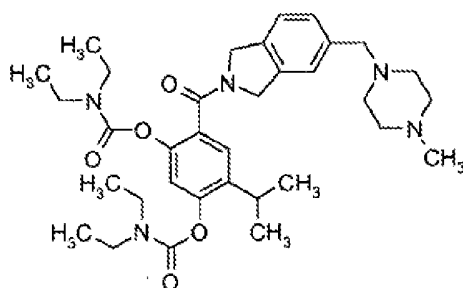
Exemplo	Composto	Nome químico	Precursor substituído do ácido benzóico	Dados de RMN	MS
1*		(4-Hidroxi-5-isopropil-2-metoxi-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidroisoindol-2-il]-metanona	Ácido 4-hidroxi-5-isopropil-2-metoxi-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 9,66 (1H, s), 7,32 (1H, m), 7,24-7,16 (2H, m), 6,97 (1H, s), 6,52 (1H, s), 4,75 (2H, br s), 4,51 e 4,49 (2H, 2xs), 3,72 (3H, s), 3,44 e 3,41 (2H, 2xs), 3,14 (1H, m), 2,31 (8H, br s), 2,14 e 2,12 (3H, 2xs), 1,15 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 424
2*		(2-Hidroxi-5-isopropil-4-metoxi-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidroisoindol-2-il]-metanona	Ácido 2-hidroxi-5-isopropil-4-metoxi-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 10,28 e 10,23 (1H, 2xbr s), 7,35-7,20 (3H, br m), 7,12 (1H, s), 6,50 (1H, s), 4,78 (4H, br s), 3,80 (3H, s), 3,43 (2H, s), 3,13 (1H, m), 2,33 (8H, br s), 2,15 (3H, s), 1,15 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 424
3*		(5-Isopropil-2,4-dimetoxi-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidroisoindol-2-il]-metanona	Ácido 5-isopropil-2,4-dimetoxi-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 7,30 (1H, m), 7,24-7,16 (2H, m), 7,04 (1H, s), 6,71 (1H, s), 4,75 (2H, br s), 4,51 e 4,49 (2H, 2xs), 3,90 (3H, s), 3,84 (3H, s), 3,44 e 3,41 (2H, 2xs), 3,19 (1H, m), 2,31 (8H, br s), 2,14 e 2,12 (3H, 2xs), 1,13 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 438

4		(2-Aliloxi-4-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona	Ácido 2-aliloxi-4-hidroxi-5-isopropil-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 9,64 (1H, s), 7,30 (1H, m), 7,24-7,16 (2H, m), 6,99 (1H, s), 6,53 (1H, s), 5,97 (1H, m), 5,32 (1H, dm), 5,17 (1H, dm), 4,77 (2H, br s), 4,53 (4H, m), 3,44 e 3,41 (2H, 2xs), 3,13 (1H, m), 2,34 (8H, br s), 2,14 e 2,12 (3H, 2xs), 1,15 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 450
5		(4-Aliloxi-2-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona	Ácido 4-aliloxi-2-hidroxi-5-isopropil-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 10,28 e 10,23 (1H, 2xbr s), 7,35-7,18 (3H, br m), 7,13 (1H, br s), 6,50 (1H, s), 6,09 (1H, m), 5,44 (1H, dm), 5,30 (1H, dm), 4,78 (4H, br s), 4,58 (2H, m), 3,45 (2H, br s), 3,18 (1H, m), 2,40 (8H, br s), 2,21 (3H, br s), 1,18 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 450
6		(2,4-Bis-aliloxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona	Ácido 2,4-bis-aliloxi-5-isopropil-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 7,31 (1H, m), 7,24-7,17 (2H, m), 7,06 (1H, s), 6,72 (1H, s), 6,11 (1H, m), 5,98 (1H, m), 5,47 (1H, dm), 5,35-5,28 (2H, m), 5,17 (1H, dm), 4,78 (2H, br s), 4,64 (4H, m), 4,52 e 4,50 (2H, 2xs), 3,44 e 3,41 (2H, 2xs), 3,21 (1H, m), 2,33 (8H, br s), 2,14 e 2,12 (3H, 2xs), 1,17 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 490

7		[4-Hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona	Ácido 4-hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 9,68 (1H, s), 7,32 (1H, m), 7,24-7,17 (2H, m), 7,01 (1H, s), 6,69 (1H, s), 5,13 (2H, s), 4,77 (2H, br s), 4,54 e 4,53 (2H, 2xs), 3,45 e 3,43 (2H, 2xs), 3,34 (3H, s), 3,12 (1H, m), 2,31 (8H, br s), 2,14 e 2,12 (3H, 2xs), 1,14 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 454
8		[2-Hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona	Ácido 2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 10,12 e 10,07 (1H, 2xbrs), 7,35-7,20 (3H, br m), 7,12 (1H, br s), 6,67 (1H, s), 5,23 (2H, s), 4,80-4,65 (4H, br m), 3,42 (5H, s), 3,18 (1H, m), 2,36 (8H, br s), 2,15 (3H, s), 1,18 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 454
9		[5-Isopropil-2,4-bis-(metoximetiloxi)fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona	Ácido 2,4-bis-(metoximetiloxi)-5-isopropil-benzóico	<sup>1</sup> H RMN (DMSO-d <sub>6</sub> ) [mistura de rotâmeros] 7,31 (1H, m), 7,24-7,16 (2H, m), 7,14 (1H, s), 6,91 (1H, s), 5,27 (2H, s), 5,18 (2H, s), 4,78 (2H, br s), 4,55 e 4,53 (2H, 2xs), 3,44 (6H, s), 3,44 e 3,41 (2H, 2xs), 3,23 (1H, m), 2,34 (8H, br s), 2,16 e 2,14 (3H, 2xs), 1,19 (6H, d)	MS: [M+H] <sup>+</sup> 498
* = exemplo comparativo					

EXEMPLO 10

Preparação do éster 5-dietilcarbamoiloxi-2-isopropil-4-[5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-ciclohexa-1,3-dienílico do ácido dietil-carbâmico

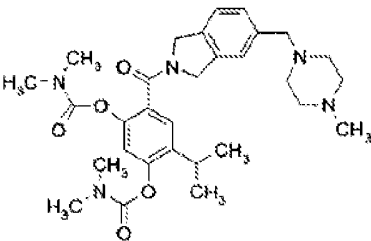
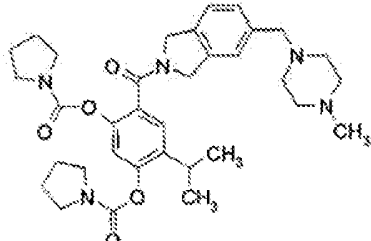


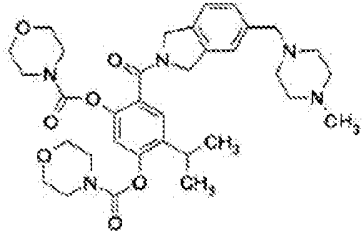
A uma solução de (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenili)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona (1,0 g, 2,44 mmol) em THF (25 mL) contendo Et<sub>3</sub>N (0,68 mL, 4,88 mmol) e N,N-4-dimetilaminopiridina (5 mg, 0,41 mmol) foi adicionado cloreto de N,N-dietilcarbamoilo (1,5 mL, 11,62 mmol). A solução foi aquecida até 60°C durante 18 h quando EtOAc (50 mL) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq a 10% (50 mL) foram adicionados. A fase orgânica foi lavada com solução salina saturada (30 mL) e a fase orgânica foi separada e evaporada até um pequeno volume. A solução do resíduo em DCM foi aplicada numa coluna contendo sílica-gel e o produto eluído sucessivamente com DCM seguido de amónia aquosa a 0,2% em MeOH a 5% em DCM. As fracções contendo produto foram evaporadas a partir de DCM seguido de éter dietílico para dar 1,07 g do composto em epígrafe como uma espuma, <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7,44 (1 H, d), 7,37-7,30 (1 H, m), 7,30-7,15 (2H, m), 7,01 (1 H, s), 4,75 (2H, s), 4,61 (2H, d), 3,56-3,40 (4H, m), 3,33 (4H, d), 3,24 (3H,

d), 3,19-3,09 (2H, m), 3,09-2,95 (2H, m), 2,85-2,56 (4H, m), 2,42 (3H, s), 1,38-0,76 (18H, m); m/z 608 (MH).

### EXEMPLOS 11 A 13

Os Exemplos 11 a 13 foram preparados através de um modo análogo ao descrito para o Exemplo 10.

Número do exemplo	Estrutura Química	m/z (MH)	RMN
11		552	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,43 (1H, d), 7,35-7,28 (1H, m), 7,26-7,16 (2H, m), 7,01 (1H, s), 4,77 (2H, d), 4,61 (2H, d), 3,43 (2H, d), 3,09 (3H, s), 3,08-3,02 (1H, m), 2,95 (3H, s), 2,88 (3H, s), 2,78 (3H, s), 2,44-2,21 (8H, m), 2,14 (3H, d), 1,20 (6H, dd).
12		604	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,42 (1H, d), 7,36-7,30 (1H, m), 7,25-7,15 (2H, m), 7,06 (1H, s), 4,76 (2H, s), 4,61 (2H, d), 3,58-3,50 (2H, m), 3,44 (2H, d), 3,41-3,34 (2H, m), 3,31 (1H, m), 3,28-3,23 (1H, m), 3,18 (2H, t), 3,12-3,01 (1H, m), 2,33 (8H, s), 2,15 (3H, d), 2,01-1,84 (4H, m), 1,80-1,70 (4H, m), 1,20 (6H, d).

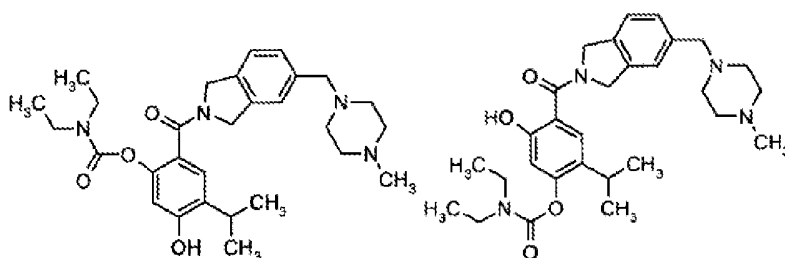
13		<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 7,47 (1H, d), 7,39-7,29 (1H, m), 7,28-7,16 (2H, m), 7,08 (1H, s), 4,78 (2H, s), 4,61 (2H, d), 3,67 (6H, s), 3,54-3,36 (10H, m), 3,36-3,21 (2H, m), 3,13-3,00 (1H, m), 2,33 (8H, s), 2,14 (3H, d), 1,27-1,16 (6H, m).
----	---	---

#### EXEMPLO 14

Éster 5-hidroxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico

#### EXEMPLO 15

Éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbon-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico



Uma solução do produto do Exemplo 10 (0,826 g) dissolvido em MeOH (36 mL) e NaOH aq 2 M (4 mL) foi aquecida a 60°C durante 24 h. A solução foi arrefecida até à TA e a esta foi adicionado HCl 5 M (1,6 mL, a pH 6) e a solução foi evaporada até um pequeno volume. O resíduo foi fraccionado

entre a solução salina saturada e EtOAc e a camada orgânica foi evaporada até ficar um óleo. O óleo foi purificado através de HPLC preparativa (método básico) para dar os dois derivados mono-dietilcarbamoil isoméricos separados:

Éster 5-hidroxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico (137 mg)

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 9,86 (1 H, s), 7,35-7,25 (1 H, m), 7,25-7,12 (3H, m), 6,65 (1 H, s), 4,71 (2H, s), 4,57 (2H, d), 3,43 (2H, d), 3,27-3,08 (5H, m), 2,32 (8H, s), 2,14 (3H, d), 1,18 (6H, d), 1,05-0,85 (6H, m), m/z 509 (MH) e

Éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico (292 mg)

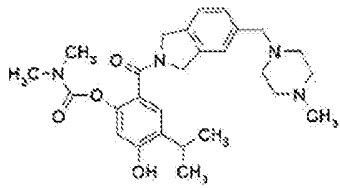
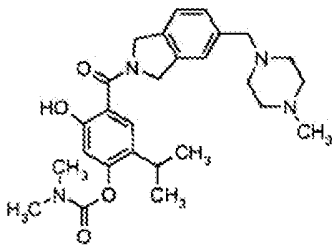
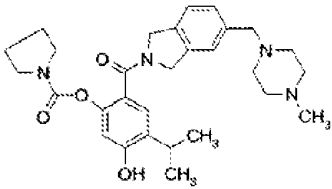
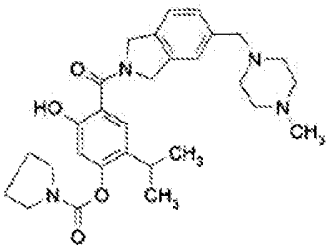
$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 10,01 (1 H, s), 7,37-7,27 (1 H, m), 7,27-7,17 (2H, m), 7,15 (1 H, d), 6,60 (1 H, s), 4,79 (2H, s), 4,63 (2H, d), 3,44 (4H, m), 3,34 (2H, m), 3,01-2,87 (1 H, m), 2,32 (8H, s), 2,14 (3H, d), 1,22 (3H, s), 1,15 (9H, d), m/z 509 (MH).

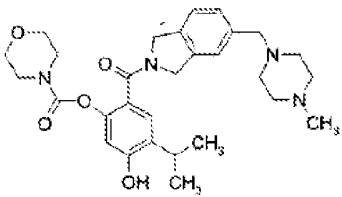
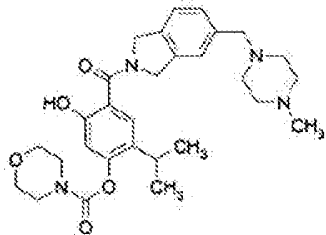
#### EXEMPLOS 16 A 21

Os Exemplos 16 a 21 foram preparados de um modo análogo ao descritos nos Exemplos 14 e 15 através de tratamento dos derivados diacilados (Exemplos 11, 12 e 13) com NaOH em MeOH (60°C h, 3,5 h - 24 h). A mistura de produtos foi separada através de HPLC preparativa.

Número do	Estrutura Química	m/z (MH)	RMN	Condições de
-----------	-------------------	----------	-----	--------------



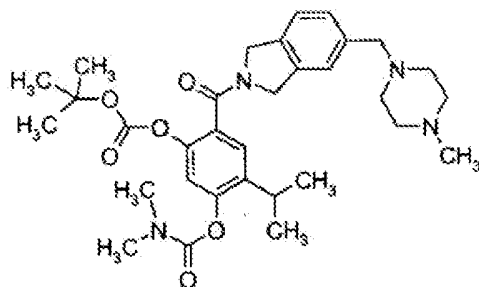
exemplo				solvente da HPLC prepara- tiva
16	 <p>Do Exemplo 11</p>	481	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 9,88 (1H, s), 7,36-7,27 (1H, m), 7,27-7,13 (3H, m), 6,64 (1H, s), 4,74 (2H, s), 4,57 (2H, d), 3,46 (2H, d), 3,24-3,13 (1H, m), 2,85 (3H, s), 2,78 (3H, s), 2,61-2,30 (8H, m), 2,25 (3H, s), 1,18 (6H, d).	Ácido*
17	 <p>Do Exemplo 11</p>	481	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,01 (1H, d), 7,37-7,27 (1H, m), 7,27-7,11 (3H, m), 6,61 (1H, s), 4,79 (2H, s), 4,63 (2H, d), 3,50-3,41 (2H, m), 3,08 (3H, s), 3,01-2,86 (4H, m), 2,35 (8H, s), 2,17 (3H, d), 1,14 (6H, d).	Ácido*
18	 <p>Do Exemplo 12</p>	507	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 9,88 (1H, s), 7,36-7,27 (1H, m), 7,27-7,12 (3H, m), 6,67 (1H, s), 4,73 (2H, s), 4,57 (2H, d), 3,43 (2H, d), 3,27 (2H, t), 3,23-3,09 (3H, m), 2,32 (8H, s), 2,14 (3H, d), 1,72 (4H, s), 1,18 (6H, d)	Básico
19		507	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 9,95 (1H, s), 7,37-7,27 (1H, m), 7,27-7,17 (2H, m), 7,14 (1 H, d), 4,79 (2H, s), 4,64 (2H, d), 3,53 (2H, t), 3,43 (2H,	Básico

	Do Exemplo 12		d), 3,40-3,34 (2H, m), 3,04-2,90 (1 H, m), 2,32 (8H, s), 2,14 (3H, d), 1,98-1,81 (4H, m), 1,15 (6H, d).	
20	 <p>Do Exemplo 13</p>	523	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 9,93 (1H, s), 7,37-7,27 (1H, m), 7,26-7,14 (3H, m), 6,66 (1H, s), 4,74 (2H, s), 4,58 (2H, d), 3,53-3,25 (10H, m), 3,25- 3,14 (1H, m), 2,32 (8H, s), 2,14 (3H, d), 1,19 (6H, d).	Básico
21	 <p>Do Exemplo 13</p>	523	<sup>1</sup> H RMN (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): 10,04 (1H, d), 7,37-7,26 (1H, m), 7,26-7,17 (2H, m), 7,16 (1H, d), 6,63 (1H, s); 4,79 (2H, s), 4,63 (2H, d), 3,65 (6H, d), 3,45 (4H, d), 3,00- 2,88 (1H, m), 2,33 (8H, s), 2,14 (3H, d), 1,15 (6H, d).	Básico seguido do método ácido*

\*O isolamento dos picos a partir do método básico de HPLC preparativa foi através de evaporação do solvente para dar a base livre. Quando foi utilizado o método ácido de HPLC, o isolamento foi através de evaporação seguida de adsorção numa coluna de permuta iónica SCX (2 g, Stata) e subsequente eluição com NH<sub>3</sub> 2 M em MeOH.

## EXEMPLO 22

Éster *terc*-butílico do éster 5-dimetilcarbamoiloxi-4-isopropil-2-[5-(4-metilpiperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido carbónico



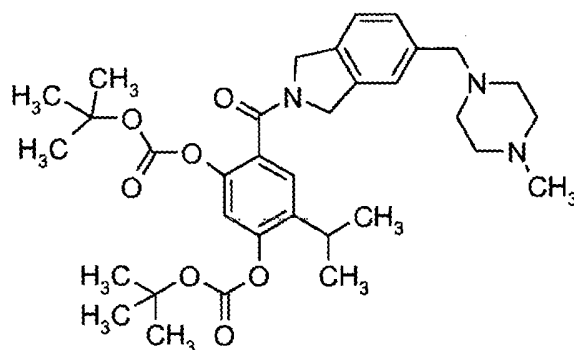
A uma solução de éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico (Exemplo 17, 50 mg) em THF (10 mL) foi adicionado di-t-butil-dicarbonato (54,5 mg) e N,N-4-dimetilaminopiridina (1,25 mg). A solução foi aquecida até 60°C durante 1 h, arrefecida até à TA e evaporada até à secura. O resíduo foi purificado em sílica-gel e eluído com amónia aquosa a 0,2% em MeOH a 5% em DCM. As fracções contendo produto foram evaporadas a partir de DCM e dietiléter para dar o composto em epígrafe como uma espuma (40 mg).

$^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7,51 (1 H, d), 7,36-7,28 (1 H, m), 7,26-7,17 (2H, m), 7,08 (1 H, s), 4,77 (2H, s), 4,62 (2H, d), 3,44 (2H, d), 3,10 (3H, s), 3,05 (1 H, dd), 2,95 (3H, s), 2,32 (8H, d), 2,14 (3H, d), 1,34 (9H, s), 1,21 (6H, dd).

A atribuição estereoquímica foi confirmada através da observação de um efeito Overhauser nuclear (nOe) entre o grupo butilo e o  $\text{CH}_2\text{N}$  da isoindolina.

### EXEMPLO 23

Éster *terc*-butílico do éster 5-*terc*-butoxicarboniloxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido carbónico

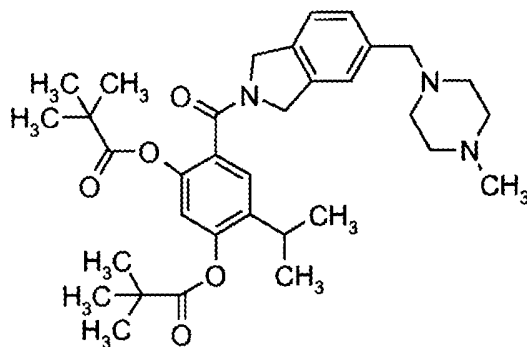


A uma solução de (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona (1 g, 2,44 mmol) em THF (25 mL) foi adicionado di-*t*-butil-dicarbonato (1,17 g, 5,5 mmol) e *N,N*-4-dimetilaminopiridina (45 mg, 0,37 mmol). A solução foi aquecida até 60°C durante 3 h depois arrefecida à TA e evaporada até à secura. O resíduo foi purificado em sílica-gel eluindo com DCM seguido por amónia aquosa a 0,2% em MeOH a 5% em DCM. As fracções contendo produto foram evaporadas até ficar uma espuma do composto em epígrafe (1,52 g).  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7,58 (1 H, d), 7,38-7,28 (1 H, m), 7,28-7,15 (3H, m), 4,77 (2H, s), 4,61 (2H, d), 3,44 (2H, d), 3,09-2,96 (1 H, m), 2,47-2,17 (8H, m), 2,15 (3H, d), 1,52 (9H, s), 1,34 (9H, s), 1,21 (6H, dd); m/z 610 (MH)

#### EXEMPLO 24

di-Cloridrato do éster 5-(2,2-dimetil-propioniloxi)-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-

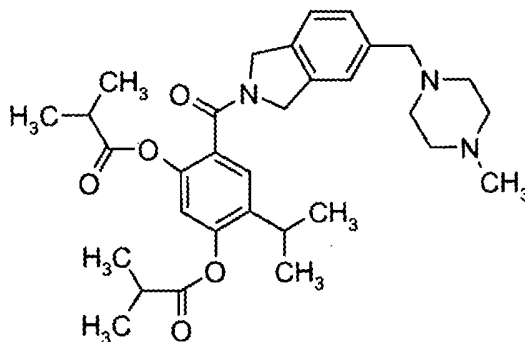
isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido 2,2-dimetil-  
propiónico



A uma solução de (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona (0,546 g, 1,33 mmol) em THF (10 mL) foi adicionado Et<sub>3</sub>N (0,464 mL), cloreto de pivaloílo (0,492 mL, 3,99 mmol) e N,N-4-dimetilaminopiridina (15 mg, 0,123 mmol). A solução foi agitada à TA durante 5 h depois o solvente foi removido através de evaporação. O resíduo foi fraccionado entre EtOAc e NaHCO<sub>3</sub> saturado e a fase orgânica foi lavada com solução salina saturada e seco (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). O solvente foi evaporado para dar um óleo que foi dissolvido em éter dietílico e EtOAc e a esta solução foi adicionado HCl 4 M em dioxano (0,67 mL, 2,68 mmol). A suspensão foi evaporada e seca sob vácuo para dar o composto em epígrafe como uma espuma (0,835 g). <sup>1</sup>H RMN (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): 7,64-7,42 (3H, m), 7,39 (1 H, d), 7,06 (1 H, s), 4,78 (2H, s), 4,61 (2H, s), 3,44 (10H, s), 3,07-2,95 (1 H, m), 2,79 (3H, s), 1,35 (9H, s), 1,20 (6H, d), 1,18-1,15 (9H, m); m/z 578 (MH).

#### EXEMPLO 25

Éster 5-isobutiriloxi-2-isopiropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido isobutírico



O composto em epígrafe foi preparado de um modo análogo ao descrito para o Exemplo 24 utilizando cloreto de isobutirilo.  $^1\text{H}$  RMN (400 MHz, DMSO- $d_6$ ): 7,53 (1 H, d), 7,38-7,28 (1 H, m), 7,28-7,16 (2H, m), 7,07 (1 H, s), 4,75 (2H, s), 4,58 (2H, d), 3,44 (2H, d), 3,07-2,95 (1 H, m), 2,95-2,83 (1 H, m), 2,72-2,64 (1 H, m), 2,48-2,18 (8H, m), 2,15 (3H, d), 1,28 (6H, d), 1,23-1,17 (6H, m), 1,08 (6H, d); m/z 510 (MH).

ATIVIDADE BIOLÓGICA

EXEMPLO 26

Calorimetria de titulação isotérmica

A capacidade dos compostos fenólicos-mãe dos compostos pró-fármacos da presente invenção para se ligarem a proteínas Hsp90 humanas pode ser determinada utilizando calorimetria de titulação isotérmica.

Experiências de calorimetria de titulação isotérmica (ITC) foram realizadas com um calorímetro de titulação VP-ITC (Microcal Inc., Northampton, MA, EUA). A clonagem, expressão e purificação do domínio N-terminal da Hsp90 $\alpha$  humana foram realizadas de acordo com métodos publicados (Jez, J.M. et al., *Chem. Biol.* 2003, Abr.; 10(4): 361-8.) Soluções do domínio N-terminal da Hsp90 $\alpha$  humana e do composto foram preparadas num tampão compreendendo Tris 25 mM, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, TCEP 1 mM, DMSO a 5%, pH 7,4. Todas as soluções foram filtradas e desgaseificadas antes de ser realizada uma titulação. A variação de entalpia resultante de cada injeção de ligando foi obtida através da integração do sinal calorimétrico. Os dados foram analisados usando Origin 7.0 (Microcal Software Inc., Northampton, MA). Os calores da diluição foram estimados usando as injeções finais de cada titulação individual e subtraídos antes do ajuste dos dados. Foram utilizados diferentes formatos experimentais de ITC para se obter as constantes de dissociação (Kd) dos compostos ao longo de um amplo intervalo de afinidades. Para compostos ligando-se fracamente foi usado um método de ITC de baixo valor de c (Turnbull W.B. & Daranas A.H. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 3 Dez.; 125(48): 14859-66) em que a proteína estava presente a 10-20  $\mu$ M na célula calorimétrica e a concentração do composto era de 1-20 mM na seringa de injeção. Neste tipo de experiência o parâmetro de estequiometria (N) foi bloqueado em 1 para ajuste dos dados. Para Kd no intervalo de 20-0,004  $\mu$ M a experiência foi configurada de modo a que a concentração do local de ligação dividida pela Kd (valor de c) estivesse entre 5 e 1000. Para a maioria destas experiências, a concentração de proteína na célula de calorimetria estava no intervalo de 4-100  $\mu$ M e a concentração do ligando na seringa de injeção variava de

50-1500  $\mu$ M. Em casos raros em que a solubilidade do composto era limitante, a solução do composto foi colocada na célula de calorimetria e titulada com proteína a partir da seringa de injeção, mantendo um valor de c entre 5 e 1000. Foram usadas experiências de ITC de competição para aceder a  $K_d < 4$  nM através da realização da titulação na presença de um competidor de ligação mais fraco de acordo com o método descrito em Sigurskjold B.W. *Anal Biochem.* 2000, 15 Jan.; 277(2): 260-6.

#### EXEMPLO 27

##### Actividade Anti-proliferativa

As actividades anti-proliferativas dos compostos-mãe dos pró-fármacos da invenção podem ser determinadas através da medição da capacidade dos compostos para inibir o crescimento celular em várias linhas celulares, tais como a linha de células de cancro do cólon humano HCT116. A inibição do crescimento celular é medida utilizando o ensaio de Azul de Alamar (Nociari, M. M, Shalev, A., Benias, P., Russo, C. *Journal of Immunological Methods* 1998, 213: 157-167). O método baseia-se na capacidade de células viáveis para reduzir a resazurina no seu produto fluorescente resorufina. Para cada ensaio de proliferação, as células são plaqueadas em placas de 96 poços e deixadas recuperar durante 16 horas antes da adição de compostos inibidores durante mais 72 horas. No final do período de incubação é adicionado Azul de Alamar a 10% (v/v) e incubase durante mais 6 horas antes da determinação do produto fluorescente a 535 nm ex./590nm em. No caso de ensaio de células não proliferantes, as células são mantidas em confluência durante 96 horas antes da adição de compostos



inibidores durante mais 72 horas. O número de células viáveis é determinado através do ensaio de Azul de Alamar tal como anteriormente. As linhas celulares podem ser obtidas em ECACC (Colecção Europeia de Culturas Celulares).

O composto-mãe dos pró-fármacos dos Exemplos 1 a 25 i.e. (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona, na forma do seu sal L-lactato, foi testado em ensaios anti-proliferativos contra cem linhas celulares através de Oncodesign (Dijon, França). Os valores de  $CI_{50}$  contra cada linha celular são expostos na tabela abaixo e os números na tabela referem-se a concentrações nanomolares. Os compostos foram testados até uma concentração de 10000 nanomolar.

Nº	Linhas celulares	Concentração do composto de teste (nanomolar)
<b>SANGUE</b>		
<b>1</b>	<b>ARH-77</b>	> 10000
<b>2</b>	<b>BV-173</b>	73
<b>3</b>	<b>CCRF-CEM</b>	107
<b>4</b>	<b>CCRF-CEM/VLB</b>	>10000
<b>5</b>	<b>Daudi</b>	136
<b>6</b>	<b>EHEB</b>	> 10000
<b>7</b>	<b>HL-60</b>	389
<b>8</b>	<b>HL-60/R10</b>	847
<b>9</b>	<b>K-562</b>	147
<b>10</b>	<b>K-562/Gleevec</b>	175
<b>11</b>	<b>KCL-22</b>	24
<b>12</b>	<b>KG-1</b>	> 10000
<b>13</b>	<b>LAMA-84</b>	1098
<b>14</b>	<b>MC90</b>	93

15	NAMALWA	93
16	OCI-AML2	> 10000
17	Raji	881
18	Ramos	46
19	RPMI 8226	10
20	RPMI 8226/Dox40	213
21	SSOBRE-B15	37
22	U-937	104
<b>CÉREBRO</b>		
23	CGL-1	> 10000
24	CGL-3	75
25	CGL-9	161
<b>MAMA</b>		
26	CAMA-1	22
27	Evsa-T	168
28	HCC1954	28
29	MCF-7	>10000
30	MCF-7/ras	166
31	MDA-MB-435	122
32	MDA-MB-435S	26
33	ZR-75-1	131
<b>CÓLON</b>		
34	DLD-1	56
35	HCT 116	38
36	HCT-15	>10000
37	LoVo	51
38	LS 174T	159
<b>TECIDO CONJUNTIVO</b>		
39	SW-872	>10000
<b>CABEÇA E PESCOÇO</b>		
40	BB30-HNSCC	273
41	BB49-HNSCC	146

42	FaDu	29
43	KB	48
44	KB3	48
45	LB1617-HNSCC	139
46	LB771-HNSCC	391
<b>RIM</b>		
47	A-498	267
48	BB64-RCC	>10000
49	BB65-RCC	1251
50	Caki-1	> 10000
51	LB1047-RCC	58
52	LB996-RCC	158
<b>FÍGADO</b>		
53	Hep 3B2.1-7	95
54	SK-HEP-1	> 10000
<b>PULMÃO</b>		
55	A-427	130
56	Calu-1	270
57	Calu-3	>10000
58	Calu-6	32
59	LB11-SCLC/OC1	17
60	LB12-SCLC/OC2	52
61	LB13-SCLC/OC3	21
62	LB37-NSCLC	63
63	LB61-NSCLC	>10000
64	NCI-H1299	587
65	NCI-H460	118
66	NCI-H520	98
67	NCI-H596	84
68	NCI-H69	162
69	NCI-H82	>10000
70	SK-MES-1	270

OVÁRIO		
71	Caov-3	94
72	IGROV-1	109
73	IGROV-1/CDDP	147
74	NIH:OVCA-3	45
75	NIH:OVCA-3/CPT20	>10000
76	PA-1	> 10000
PÂNCREAS		
77	BxPC-3	196
78	Capan-2	144
79	PANC-1	327
PRÓSTATA		
80	DU 145	85
81	LNCaP-FGC	78
PELE		
82	A-375	1481
83	A-375-SM	340
84	A-431	3799
85	BB74-MEL	162
86	CMEL-5	130
87	Hs 294T	219
88	LB1319-MEL	35
89	Malme-3M	157
90	SK-MEL-2	138
91	SK-MEL-5	185
92	UZG4-MEL	180
ESTÔMAGO		
93	AGS	66
94	Hs 746T	34
95	KATO III	162
TIRÓIDE		

<b>96</b>	<b>FTC-238</b>	26
<b>BEXIGA</b>		
<b>97</b>	<b>J82</b>	20
<b>98</b>	<b>LB796-BLC</b>	83
<b>99</b>	<b>LB831-BLC</b>	149
<b>100</b>	<b>T24</b>	852

Os resultados demonstram que (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona tem potente actividade anti-proliferativa contra um grande espectro de diferentes linhas celulares.

#### FORMULAÇÕES FARMACÊUTICAS

##### EXEMPLO 28

###### (i) Formulação de Comprimidos

Uma composição de comprimidos contendo um composto da invenção é preparada através da mistura de 50 mg do composto com 197 mg de lactose (BP) como diluente, e 3 mg de estearato de magnésio como lubrificante e compressão para formar um comprimido de um modo conhecido.

###### (ii) Formulação de Cápsulas

Uma formulação de cápsulas é preparada através da mistura de 100 mg de um composto da invenção com 100 mg de lactose e enchimento da mistura resultante em cápsulas de gelatina dura opacas padrão.

###### (iii) Formulação Injectável I

Uma composição parentérica para administração através de injeção pode ser preparada através da dissolução de um composto da invenção (p. ex. numa forma de sal) em água contendo propilenoglicol a 10% para dar uma concentração de composto activo de 1,5% em peso. A solução é então esterilizada por filtração, enchida numa ampola e selada.

(iv) Formulação Injectável II

Uma composição parentérica para injeção é preparada através de dissolução em água de um composto da invenção (p. ex. na forma de sal) (2 mg/mL) e manitol (50 mg/mL), esterilização por filtração da solução e enchimento em frascos seláveis de 1 ml ou ampolas.

(v) Formulação Injectável III

Uma formulação para distribuição i.v. através de injeção ou infusão pode ser preparada através de dissolução do composto de fórmula (I) (p. ex. numa forma de sal) em água a 20 mg/ml. O frasco é então selado e esterilizado através de autoclavagem.

vi) Formulação Injectável IV

Uma formulação para distribuição i.v. através de injeção ou infusão pode ser preparada através de dissolução do composto de fórmula (I) (p. ex. numa forma de sal) em água contendo um tampão (p. ex. acetato 0,2 M pH 4,6) a 20 mg/ml. O frasco é então selado e esterilizado através de autoclavagem.

(vii) Formulação de Injeção Subcutânea

Uma composição para administração subcutânea é preparada através da mistura de um composto da invenção com óleo de milho de grau farmacêutico para dar uma concentração de 5 mg/ml. A composição é esterilizada e enchida num recipiente adequado.

viii) Formulação Liofilizada

Alíquotas de composto formulado de fórmula (I) são colocadas em frascos de 50 ml e liofilizadas. Durante a liofilização, as composições são congeladas utilizando um protocolo de congelação de um só passo a (-45°C). A temperatura é elevada até -10°C para emparelhamento, em seguida reduzida para congelação a -45°C, seguido de secagem primária a +25°C durante aproximadamente 3400 minutos, seguido por uma secagem secundária com passos de aumento da temperatura até 50°C. A pressão durante a secagem primária e secundária é regulada a 80 millitor.

(ix) Formulação em Gel Tópica a 2%

	<u>% p/p</u>
Composto	2,00
Hidroxipropilmetilcelulose (Methocel F4M)	2,50
Polietileno-óxido (Polyox WSR -205)	0,25
Propilenoglicol	10,00
Metilparabeno	0,15
Propilparabeno	0,05
Água purificada para	100,00

EXEMPLO 29

### Estudos de Estabilidade no Plasma

A facilidade com que os compostos pró-fármacos da invenção podem ser convertidos na porção activa pode ser avaliada através da medição da estabilidade dos compostos no plasma *in vitro*. O método baseia-se na capacidade das enzimas do plasma para metabolizar compostos na porção activa. Os compostos são adicionados a plasma e incubados a 37°C durante aproximadamente 1 hora. Alíquotas de plasma são removidas a intervalos de tempo e o composto extraído através da adição de acetonitrilo contendo um padrão interno. Todos os extractos são então analisados quanto ao composto-mãe, a porção activa e o padrão interno usando um ensaio LCMS-MS específico do composto. A estabilidade é medida através da comparação da razão da área do pico do composto-mãe e do padrão interno no tempo zero com uma área do pico do composto-mãe e do padrão interno nas amostras incubadas. A geração da porção activa nas amostras é também avaliada.

### EXEMPLO 30

#### Investigação da Estabilidade em Sangue Completo e em Homogenato de Fígado.

A degradação de um pró-fármaco *in vivo* pode ocorrer num ou mais de vários diferentes compartimentos incluindo por exemplo sangue/plasma, fígado, estômago, tecido alvo (p. ex. tumor). A localização preferida para a formação óptima do fármaco-mãe dependerá da disposição *in vivo* do pró-fármaco e do fármaco-mãe e de uma compreensão das concentrações óptimas de cada um necessárias na circulação



para maximizar a exposição à porção activa no tecido alvo. O potencial para que as moléculas de pró-fármaco distribuam o fármaco-mãe activo pode ser avaliada *in vitro* através da medição da degradação de um pró-fármaco na presença de fluidos corporais relevantes. Para a finalidade de obter uma compreensão preliminar da estabilidade de compostos da presente invenção para hidrólise enzimática em dois desses compartimentos corporais, a renovação do composto foi estudada após incubação em sangue completo e homogenato de fígado de ratinhos e humanos. Os dados obtidos a partir destes estudos proporcionam uma compreensão preliminar de quais pró-fármacos são mais capazes de distribuir o composto-mãe (i.e. são mais rapidamente degradados no composto-mãe) nestes compartimentos. Outros estudos podem também determinar a estabilidade noutros compartimentos (p. ex. nos tumores alvo através da medição da estabilidade em lisados de tumores).

Para estes estudos, sangue completo humano foi colhido a partir de 3 voluntários saudáveis do sexo masculino em tubos de heparina de lítio. O sangue foi reunido e armazenado à temperatura ambiente durante um máximo de 2 horas antes do início das incubações. Sangue de ratinho foi colhido a partir de 70 ratinhos machos, estirpe: Balb/c em tubos de heparina de lítio e reunido.

Fígados de ratinho foram obtidos a partir de 20 ratinhos machos, estirpe: Balb/c a partir de animais de reserva. Foi obtido tecido de fígado humano a partir de 3 indivíduos provenientes de um banco de tecidos humanos no Reino Unido. Os fígados foram armazenados congelados. Os fígados foram descongelados e depois homogeneizados para formar um homogenato de aproximadamente 30% (p/v) em tampão fosfato,

100 mM, pH 7,4 (referido como "tampão"). Os homogenatos foram mantidos em gelo até à sua utilização.

Cada incubação consistiu num volume de 1 mL. Soluções de dosagem do composto de teste foram então adicionadas em cada homogenato a uma concentração final de composto de 1  $\mu$ M. As incubações foram efectuadas na atmosfera de um banho de água com agitação a 37°C.

Uma alíquota das amostras de incubação foi removida para um volume igual de acetonitrilo gelado, em vários momentos. Amostras (sangue completo/homogenato + acetonitrilo) foram centrifugadas e alíquotas do sobrenadante foram analisadas através de UPLC-MS/MS.

O composto X (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona) e os compostos dos Exemplos 1 a 24 foram incubados tanto em sangue completo como em homogenato de fígado por Quotient Bioresearch (Rushden, RU). As percentagens restantes de composto-mãe após incubação em sangue completo/homogenato de fígado de humano e ratinho são expostas na tabela abaixo.

Número do Exemplo	Percentagem restante			
	Sangue de ratinho	Sangue humano	Fígado de ratinho	Fígado humano
X	102%	100%	112%	94%
1	104%	100%	104%	99%
2	129%	122%	100%	85%
3	100%	107%	93%	79%
4	106%	109%	63%	92%

5	124%	115%	86%	81%
6	125%	105%	75%	94%
7	104% *	109%	115%	92%
8	104%	114%	79%	102%
9	105% *	111%	82%	98%
10	93%	108%	60%	56%
11	38%	93%	1%	31%
12	37%	110%	1%	43%
13	0%	76%	0%	0%
14	94%	94%	89%	88%
15	58%	123%	26%	35%
16	91%	104%	82%	73%
17	24%	90%	0%	0%
18	103% *	110%	80%	65%
19	79% *	102%	0%	0%
20	16%	97%	45%	23%
21	0%	82%	0%	0%
22	0%	18%	0%	6%
23	0%	26%	0%	1%
24	0%	11%	0%	2%
* Para estas incubações a percentagem restante indicada é aos 60 minutos e não 120 minutos como indicado.				

### EXEMPLO 31

#### Farmacocinética em Ratinho

Ratinhos Balb/c são administrados com pró-fármaco através de uma gavagem oral. Uma única administração de um dos 24 exemplos é dada e um volume de dose de 10 mL/kg é utilizado para doses PO.

Amostras de sangue são colhidas em tubos revestidos com heparina de lítio em momentos seleccionados. O plasma é isolado através de centrifugação e congelado antes da análise.

Amostras de plasma são preparadas através de extracção líquido-líquido com Acetonitrilo contendo padrão interno. A quantificação é por comparação com uma curva de calibração padrão construída com cada composto e usando um método de LC-MS/MS específico para cada composto. Os animais aos quais tinha sido administrado um dos 24 exemplos foram analisados quanto ao pró-fármaco e composto X (2,4-di-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona). Os parâmetros farmacocinéticos são calculados usando o software de análise não compartimental WinNonLin®.

A  $AUC_{0,25-2\text{ h}}$  do plasma após administração PO de exemplos seleccionados é exposta na tabela abaixo. Para os exemplos 16, 17 e 11, a  $AUC_{0,25-2\text{ h}}$  do plasma foi determinada após uma única dose de 120  $\mu\text{moles/kg}$  ou 240  $\mu\text{moles/kg}$ . Deste modo, o composto do exemplo 17 proporcionou uma exposição óptima do agente farmacêutico activo relativamente à dose de partida.

Exemplo	Nível de dose ( $\mu\text{moles/kg}$ )	$AUC_{0,25-2\text{ h}}$	
		Exemplo	Composto X
16	120	280	73
17	120	1534	298
11	240	13512	247

Em estudos separados, mostrou-se que os exemplos 17 e 11 eram bem tolerados após administração de quatro doses

diárias consecutivas a 120  $\mu\text{moles/kg}$  ou 240  $\mu\text{moles/kg}$ , respectivamente.

### EXEMPLO 32

#### Determinação da Actividade Antifúngica

A actividade antifúngica dos compostos-mãe activos dos compostos pró-fármacos da invenção é determinada utilizando o seguinte protocolo.

Os compostos são testados contra um painel de fungos incluindo *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida albicans* ATCC-36082 e *Cryptococcus neoformans*. Os organismos de teste são mantidos em inclinações de Agar de Sabour e Dextrose a 4°C. Suspensões individuais de cada organismo são preparadas fazendo crescer a levedura de um dia para o outro a 27°C num tambor rotativo em caldo de base de azoto de leveduras (YNB) com aminoácidos (Difco, Detroit, Mich.), pH 7,0 com ácido propanossulfónico de morfolina (MOPS) 0,05. A suspensão é então centrifugada e lavada duas vezes com NaCl a 0,85% antes de sujeitar a ultra-sons a suspensão celular lavada durante 4 segundos (Branson Sonifier, modelo 350, Danbury, Conn.). Os blastósporos individuais são contados num hemocitómetro e ajustados à concentração desejada em NaCl a 0,85%.

A actividade dos compostos de teste é determinada utilizando uma modificação de uma técnica de microdiluição em caldo. Os compostos de teste são diluídos em DMSO a uma razão de 1,0 mg/ml, em seguida diluídos até 64  $\mu\text{g/mL}$  em caldo YNB, pH 7,0 com MOPS (é utilizado Fluconazole como controlo) para proporcionar uma solução de trabalho de cada

composto. Utilizando uma placa de 96 poços, os poços 1 e 3 até 12 são preparados com caldo YNB, diluições de dez vezes da solução do composto são feitas nos poços 2 a 11 (os intervalos de concentração são 64 a 0,125 µg/mL). O poço 1 serve como controlo da esterilidade e o branco para os ensaios espectrofotométricos. O poço 12 serve como controlo do crescimento. As placas de microtítulo são inoculadas com 10 µl em cada poço 2 a 11 (o tamanho final do inóculo é de  $10^4$  organismos/mL). As placas de inóculo são incubadas durante 48 horas a 35°C. Os valores de MIC são determinados espectrofotometricamente através da medição da absorvância a 420 nm (Automatic Microplate Reader, DuPont Instruments, Wilmington, Del.) após agitação das placas durante 2 minutos com uma misturadora de vórtice (Vorte-Genie 2 Mixer, Scientific Industries, Inc., Bolemia, N.Y.). O ponto final de MIC é definido como a menor concentração de fármaco apresentando uma redução de aproximadamente 50% (ou mais) do crescimento em comparação com o poço de controlo. Com o ensaio de turbidez esta é definida como a menor concentração de fármaco a que a turbidez no poço é <50% do controlo ( $CI_{50}$ ). As Concentrações Mínimas Citolíticas (MCC) são determinadas através de subcultura de todos os poços da placa de 96 poços numa placa de Agar Dextrose Sabourahd (SDA), incubação durante 1 a 2 dias a 35°C e depois verificação da viabilidade.

### EXEMPLO 33

#### Métodos de Teste da Actividade de Redução de Dor ou de Prevenção de Dor

##### (I) Teste de hiperalgesia inflamatória

A hiperalgesia mecânica pode ser examinada num modelo de rato de dor inflamatória. Os limiares de retirada da pata para um estímulo de pressão crescente são medidos através da técnica de Randal-Sellito utilizando um analgesímetro (Ugo Basile, Milão), em animais ingênuos antes de uma injeção intraplantar de adjuvante completo de Freund (FCA) na pata traseira esquerda. 24 h mais tarde, os limiares de retirada da pata são medidos novamente antes (pré-dose) e depois de 10 min. a 6 h após a administração do fármaco ou veículo. A reversão da hiperalgesia na pata ipsilateral é calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ reversão} = \frac{\text{limiar pós-dose} - \text{limiar pré-dose}}{\text{limiar ingênuo} - \text{limiar pré-dose}} \times 100$$

(ii) Teste de hiperalgesia neuropática

A hiperalgesia mecânica pode ser examinada num modelo de rato de dor neuropática induzida por ligação parcial do nervo ciático esquerdo. Aproximadamente 14 dias após cirurgia, os limiares de retirada mecânica tanto da pata ligada (ipsilateral) como da não ligada (contralateral) são medidos antes (pré-dose) e depois de 10 minutos a 6 h após a administração do fármaco ou veículo. A reversão da hiperalgesia em cada ponto de tempo é calculada de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ reversão} = \frac{\text{limiar pós-dose ipsilateral} - \text{limiar pré-dose ipsilateral}}{\text{limiar pré-dose contralateral} - \text{limiar pré-dose ipsilateral}} \times 100$$

Todas as experiências são realizadas utilizando grupos de 6 animais. Concentrações de reserva de fármacos são

dissolvidas em água destilada e diluições posteriores foram feitas em solução salina a 0,9% para administração subcutânea num volume de 4 mLkg<sup>-1</sup>. Todos os fármacos são preparados em frascos de plástico e mantidos no escuro.

É realizada análise estatística das leituras do limiar de retirada (g) utilizando ANOVA com medições repetidas, seguida de teste de HSD de Tukey. A eficácia refere-se à reversão máxima da hiperalgesia observada às doses utilizadas.

(iii) Testes dos efeitos dos compostos-mãe activos dos compostos pró-fármacos da invenção num Modelo de Rato de Dor de Cancro Ósseo

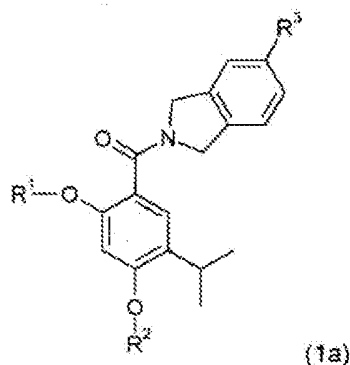
São dadas a ratos fêmeas adultos injeções intra-tibiais de células de carcinoma da glândula mamária de rato MRMZ-1 (3 µL, 10<sup>7</sup> células/mL). Os animais desenvolvem tipicamente gradualmente hiperalgesia mecânica, alodinia mecânica (sensibilidade da pele a estímulos não nocivos) e limitação dos membros posteriores, começando no dia 12-14 após a injeção das células. Um composto de fórmula (0) (p. ex. a uma dose de 10 e 30 µg/kg s.c.) é administrado 3 vezes por semana desde o dia da injeção das células, e a extensão da inibição da limitação dos membros posteriores e alodinia mecânica é determinada em comparação com controlos tratados com veículo.

Lisboa,



## REIVINDICAÇÕES

1. Composto de fórmula (1a):



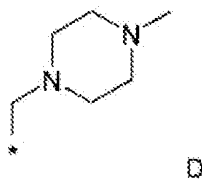
ou um sal, solvato, N-óxido ou tautómero deste;

em que ou  $R^1$  é  $R^{1a}$  e  $R^2$  é  $R^{2a}$ ; ou  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$ ; desde que em cada caso pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  seja diferente de hidrogénio;

$R^{1a}$  e  $R^{2a}$  são iguais ou diferentes e cada um é seleccionado a partir de hidrogénio, alquilo  $C_{1-4}$ , alcenilo  $C_{2-4}$  e alcinilo  $C_{2-4}$  em que o alquilo  $C_{1-4}$  é substituído por alcóxido  $C_{1-2}$ ;

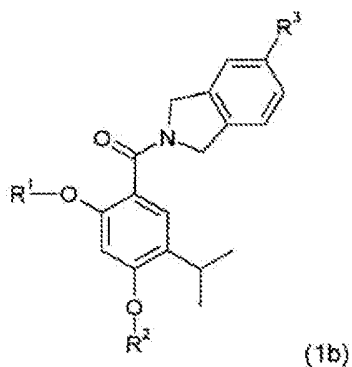
$R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio,  $C(O)NR^4R^5$ ,  $C(O)R^6$  e  $C(O)OR^6$  em que  $R^6$  é alquilo  $C_{1-4}$ ,  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ , ou  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros contendo opcionalmente um segundo membro do anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  e/ou um ou dois grupos oxo;  
e

$R^3$  é um grupo D:



em que o asterisco denota o ponto de ligação ao anel isoindolina; mas excluindo o composto éster 5-acetoxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-dihidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido acético.

2. Composto de acordo com a reivindicação 1 de fórmula (1b):



ou um sal, solvato, N-óxido ou tautómero deste;

em que  $R^1$  é  $R^{1a}$  e  $R^2$  é  $R^{2a}$ ; ou  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$ ; desde que em cada caso pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  seja diferente de hidrogénio;

$R^{1a}$  e  $R^{2a}$  são iguais ou diferentes e cada um é seleccionado a partir de hidrogénio, alquilo  $C_{1-2}$ , alcenilo  $C_{2-3}$  e alcinilo  $C_{2-3}$  em que o alquilo  $C_{1-2}$  é substituído por metoxilo;

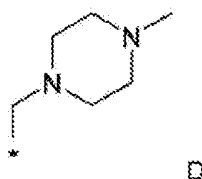
$R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio e  $C(O)NR^4R^5$ , em que  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ ; ou  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros contendo opcionalmente um segundo membro do anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e

formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  e/ou um ou dois grupos oxo; ou

$R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio e  $C(O)R^{6a}$ , em que  $R^{6a}$  é alquilo  $C_{2-4}$ ; ou

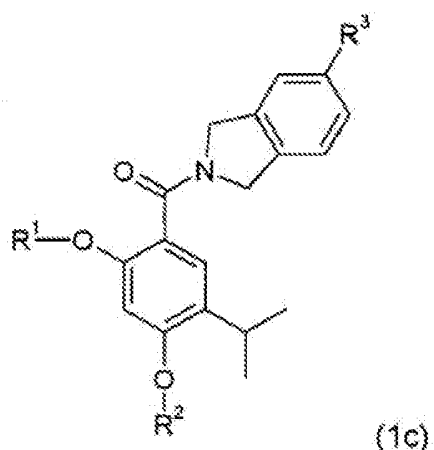
$R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio e  $C(O)R^6$  em que  $R^6$  é seleccionado a partir de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo e terc-butilo; ou

um de  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  é  $C(O)NR^{4a}R^{5a}$  em que  $R^{4a}$  e  $R^{5a}$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ , e o outro de  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  é seleccionado a partir de  $C(O)R^6$  e  $C(O)OR^6$ ; e  $R^3$  é um grupo D:

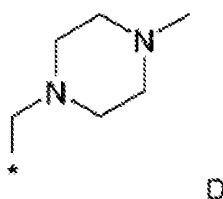


em que o asterisco denota o ponto de ligação ao anel isoindolina.

3. Composto de acordo com a reivindicação 2 de fórmula (1c):



ou um sal, solvato, N-óxido ou tautómero deste;  
 em que  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$ ; desde que pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  seja diferente de hidrogénio;  
 $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio e  $C(O)NR^4R^5$ , em que  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ ; ou  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros contendo opcionalmente um segundo membro do anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  e/ou um ou dois grupos oxo; e  
 $R^3$  é um grupo D:



em que o asterisco denota o ponto de ligação ao anel isoindolina.

4. Composto de acordo com a reivindicação 1 em que  $R^1$  é  $R^{1a}$  e  $R^2$  é  $R^{2a}$  e  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  são, cada um, seleccionados a partir de hidrogénio, metilo, metoximetilo e alilo.

5. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 em que  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$  e  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio,  $C(O)NR^4R^5$ ,  $C(O)R^6$  e  $C(O)OR^6$  em que  $R^6$  é alquilo  $C_{1-4}$ ,  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ .
6. Composto de acordo com a reivindicação 1 em que  $R^6$  é seleccionado a partir de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, 1-metilpropilo, 2-metilpropilo e *terc*-butilo.
7. Composto de acordo com a reivindicação 6 em que  $R^6$  é alquilo  $C_{2-4}$ .
8. Composto de acordo com a reivindicação 5 em que:
- $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio e  $C(O)OR^6$ ; e
  - $R^6$  é *terc*-butilo ou isopropilo.
9. Composto de acordo com a reivindicação 3 ou reivindicação 5 em que  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e cada um é hidrogénio ou um grupo  $C(O)NR^4R^5$ , onde  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros contendo opcionalmente um segundo membro do anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  e/ou um ou dois grupos oxo.
10. Composto de acordo com a reivindicação 8 em que o anel heterocíclico saturado é seleccionado a partir de

pirrolidina, piperidina, piperazina, 4-metilpiperazina e morfolina.

11. Composto de acordo com a reivindicação 1 que é seleccionado a partir de:

(2-aliloxi-4-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

(4-aliloxi-2-hidroxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

(2,4-bis-aliloxi-5-isopropil-fenil)-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

[4-hidroxi-5-isopropil-2-(metoximetiloxi)-fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

[2-hidroxi-5-isopropil-4-(metoximetiloxi)-fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

[5-isopropil-2,4-bis-(metoximetiloxi)-fenil]-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-il]-metanona;

éster 5-dietilcarbamoiloxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico;

éster 5-dimetilcarbamoiloxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;

2-[2,4-bis-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[2,4-bis-(morfolin-4-ilcarboniloxi)-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

éster 5-hidroxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico;

éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dietil-carbâmico;

éster 5-hidroxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;

éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico;

2-[2-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)-4-hidroxi-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[4-(pirrolidin-1-ilcarboniloxi)-2-hidroxi-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[2-(morfolin-4-ilcarboniloxi)-4-hidroxi-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

2-[4-(morfolin-4-ilcarboniloxi)-2-hidroxi-5-isopropil-benzoil]-5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol;

éster *terc*-butílico do éster 5-dimetilcarbamoiloxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido carbónico;

éster *terc*-butílico do éster 5-*terc*-butoxicarboniloxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-

hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido carbónico;

éster 5-(2,2-dimetil-propioniloxi)-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido 2,2-dimetil-propiónico;

éster 5-isobutiriloxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido isobutírico;

e sais, solvatos, tautómeros e N-óxidos destes.

12. Éster 5-hidroxi-2-isopropil-4-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico do ácido dimetil-carbâmico.

13. Composição farmacêutica compreendendo um composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 12 e um transportador farmacêuticamente aceitável.

14. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10 ou uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13 para utilização:

(i) como um inibidor de Hsp90; ou

(ii) na profilaxia ou no tratamento de um estado ou condição de doença mediados por Hsp90; ou

(iii) em tratamento de uma doença ou condição compreendendo ou surgindo de crescimento celular anormal num mamífero; ou

(iv) em tratamento de cancro; ou

(v) no tratamento de um carcinoma da bexiga, da mama, do cólon (p. ex. carcinomas colorrectais tais como adenocarcinoma do cólon e adenoma do cólon), do rim, da epiderme, do fígado, do pulmão, por exemplo adenocarcinoma, cancro do pulmão de células pequenas e



carcinomas do pulmão de células não pequenas, do esófago, da vesícula biliar, do ovário, do pâncreas p. ex. carcinoma pancreático exócrino, do estômago, do colo do útero, da tiróide, da próstata, do sistema gastrointestinal, p. ex. tumores do estroma gastrointestinal, ou da pele, por exemplo carcinoma de células escamosas; um tumor hematopoético da linhagem linfóide, por exemplo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B (tal como linfoma difuso de grandes células B), linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, linfoma de células pilosas, ou linfoma de Burkitt; um tumor hematopoético de linhagem mielóide, incluindo leucemia mielóide aguda, leucemias mielóides crónicas, leucemias mielogenosas, e leucemias mielogenosas crónicas sensíveis e refractárias a Imatinib, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo sensível e refractário a Bortezomib, doença mieloproliferativa ou leucemia promielocítica; cancro folicular da tiróide; um tumor de origem mesenquimatosa, por exemplo fibrossarcoma ou rabdomiossarcoma; um tumor do sistema nervoso central ou periférico, por exemplo astrocitoma, neuroblastoma, glioma (um glioma de elevado grau) ou schwannoma; melanoma (p. ex. melanoma maligno ou metastático); seminoma; teratocarcinoma; osteossarcoma; queratoacantoma; cancro folicular da tiróide; ou sarcoma de Kaposi. Um outro exemplo de um tumor de origem mesenquimatosa é o sarcoma de Ewing; ou

(vi) no tratamento de um carcinoma da bexiga, da mama, do cólon (p. ex. carcinomas colorrectais tais como adenocarcinoma do cólon e adenoma do cólon), do rim, da epiderme, do fígado, do pulmão, por exemplo

adenocarcinoma, cancro do pulmão de células pequenas e carcinomas do pulmão de células não pequenas, da vesícula biliar, do ovário, do pâncreas p. ex. carcinoma pancreático exócrino, do estômago, da tiróide, da próstata, do sistema gastrointestinal, p. ex. tumores do estroma gastrointestinal, ou da pele, por exemplo carcinoma de células escamosas; um tumor hematopoético da linhagem linfóide, por exemplo leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, linfoma de células B (tal como um linfoma difuso de grandes células B), linfoma de células T, linfoma de Hodgkin, linfoma não-Hodgkin, linfoma de células pilosas, ou linfoma de Burkitt; um tumor hematopoético de linhagem mielóide, incluindo leucemia mielóide aguda, leucemias mielóides crónicas, leucemias mielogenosas, e leucemias mielogenosas crónicas sensíveis e refractárias a Imatinib, síndrome mielodisplásica, mieloma múltiplo sensível e refractário a Bortezomib, doença mieloproliferativa ou leucemia promielocítica; cancro folicular da tiróide; um tumor de origem mesenquimatosa, por exemplo fibrossarcoma ou rabdomiossarcoma; um tumor do sistema nervoso central ou periférico, por exemplo astrocitoma, glioma (um glioma de elevado grau); melanoma (p. ex. melanoma maligno ou metastático); osteossarcoma; ou cancro folicular da tiróide. Um outro exemplo de um tumor de origem mesenquimatosa é o sarcoma de Ewing; ou

(vii) no tratamento de um cancro seleccionado a partir de cancro metastático da mama que seja positivo para HER2; adenocarcinoma da próstata; melanoma metastático; carcinoma do pulmão de células não pequenas (NSCLC); carcinoma do pulmão de células

pequenas (SCLC); gliomas de elevado grau; tumores do estroma gastrointestinal (GIST); cancro colorrectal; glioblastoma; melanoma; cancro metastático da tiróide; cancro da próstata; e cancro rectal; ou  
(viii) o tratamento de um cancro seleccionado a partir de cancro colorrectal; glioblastoma; melanoma; cancro metastático da tiróide; cancro da próstata; e cancro rectal; ou  
(ix) em medicina.

15. Utilização de um composto tal como definido em qualquer um das reivindicações 1 a 12 ou uma composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 13 para o fabrico de um medicamento para qualquer uma ou mais utilizações tal como definidas na reivindicação 14.

Lisboa,

**RESUMO**  
**"COMPOSTOS FARMACÊUTICOS"**

A invenção proporciona um composto da fórmula (1): ou um sal, solvato, N-óxido ou tautómero deste; em que  $R^1$  é  $R^{1a}$  e  $R^2$  é  $R^{2a}$ ; ou  $R^1$  é  $R^{1b}$  e  $R^2$  é  $R^{2b}$ ; desde que em cada caso pelo menos um de  $R^1$  e  $R^2$  seja diferente de hidrogénio;  $R^{1a}$  e  $R^{2a}$  são iguais ou diferentes e cada um é seleccionado a partir de hidrogénio, alquilo  $C_{1-4}$ , alcenilo  $C_{2-4}$  e alcinilo  $C_{2-4}$  em que o alquilo  $C_{1-4}$  é opcionalmente substituído por alcóxilo  $C_{1-2}$ ;  $R^{1b}$  e  $R^{2b}$  são iguais ou diferentes e são seleccionados a partir de hidrogénio,  $C(O)NR^4R^5$ ,  $C(O)R^6$  e  $C(O)OR^6$  em que  $R^6$  é alquilo  $C_{1-4}$ ,  $R^4$  e  $R^5$  são ambos alquilo  $C_{1-4}$ , ou  $NR^4R^5$  forma um anel heterocíclico saturado de 4 a 7 membros contendo opcionalmente um segundo membro de anel de heteroátomos seleccionado a partir de O, N ou S e formas oxidadas de N e S, sendo o anel heterocíclico opcionalmente substituído por um ou dois grupos alquilo  $C_{1-4}$  e/ou um ou dois grupos oxo; e  $R^3$  é um grupo (D): em que o asterisco denota o ponto de ligação ao anel isoindolina; mas excluindo o éster 5-acetoxi-4-isopropil-2-[5-(4-metil-piperazin-1-ilmetil)-1,3-di-hidro-isoindol-2-carbonil]-fenílico de ácido acético.