



(11) *Número de Publicação:* PT 810223 E

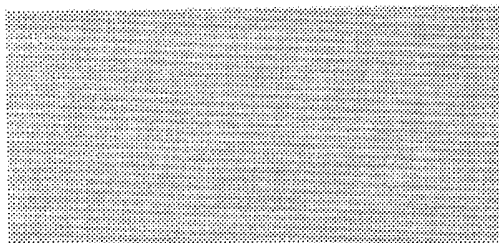
(51) *Classificação Internacional:* (Ed. 6)
C07D401/14 A C07D401/06 B
A61K031/44 B

(12) *FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO*

(22) <i>Data de depósito:</i> 1997.05.16	(73) <i>Titular(es):</i> PFIZER INC. 235 EAST 42ND STREET NEW YORK, NY 10017 US
(30) <i>Prioridade:</i> 1996.05.28 US 18490 P	
(43) <i>Data de publicação do pedido:</i> 1997.12.03	(72) <i>Inventor(es):</i> ROBERT ALFRED VOLKMANN JOSEPH PETER LYSSIKATOS US US
(45) <i>Data e BPI da concessão:</i> 2001.07.25	(74) <i>Mandatário(s):</i> ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VITOR CORDON, Nº 14 - 3º 1200 LISBOA PT

(54) *Epígrafe:* OXINDOLES SUBSTITUÍDOS POR ADAMANTILO COMO AGENTES FARMACÉUTICOS

(57) *Resumo:*



Pte 8 10223 11

- 1 -

Adriano C. C. C.

DESCRIÇÃO

"OXINDOLES SUBSTITUÍDOS POR ADAMANTILO COMO AGENTES FARMACÊUTICOS"

Esta invenção refere-se ao uso de certos compostos heterocíclicos substituídos para o tratamento do cancro. Os agentes terapêuticamente activos desta invenção exibem actividade como inibidores da enzima farnesil-proteína-transferase. E crê-se que são úteis como agentes anti-cancerígenos e anti-tumorais.

Outros compostos que inibem a farnesil-proteína-transferase e que se crê serem úteis como agentes anti-cancerígenos e anti-tumorais estão referidos no Pedido de Patente Internacional PCT/US 92/11292, que designa os Estados Unidos e foi publicado a 22 de Julho de 1993 como WO 93/14085; Patente dos Estados Unidos 4.876.259, que foi concedida a 24 de Outubro de 1989; Pedido de Patente Internacional PCT/1B95/00189, apresentado a 20 de Março de 1995 e publicado a 9 de Novembro de 1995 como WO 95/29909; e o Pedido de Patente dos Estados Unidos 08/737.376 apresentado a 20 de Março de 1995 e concedido a 29 de Dezembro de 1998 como Patente dos Estados Unidos No. 5.854.232.

O pedido WO 93/23375 descreve derivados de adamantilo de piridilmetoxicarbonilo e seu uso no tratamento dos cancros dependentes do androgénio. Estes compostos não são estruturalmente próximos dos compostos reivindicados na presente invenção. O pedido WO 95/32949 descreve inibidores da far-

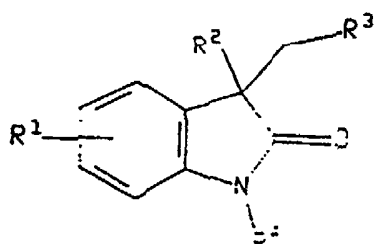
nesilação da proteína oncogénica "Ras" que são úteis para o tratamento do cancro. Estes compostos têm uma estrutura baseada em hexa-hidro-oxepina e, mais uma vez, não são estruturalmente próximos dos compostos presentemente reivindicados.

É frequente os oncogénios codificarem componentes proteicos de vias de transdução de sinais que levam à estimulação do crescimento celular e da mitogénese. A expressão oncogénica em células de cultura conduz a transformação celular, caracterizada pela capacidade das células se desenvolverem em agar mole e o desenvolvimento das células como focos densos aos quais falta a inibição de contacto que as células não-transformadas exibem. A mutação e/ou sobre-expressão de certos oncogénios é frequentemente associada ao cancro dos seres humanos.

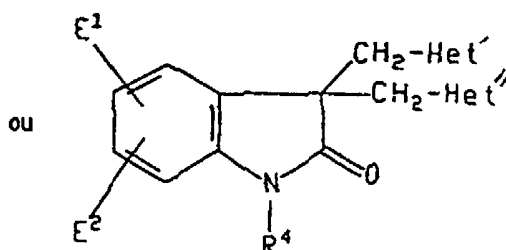
Para adquirir um potencial de transformação, o precursor da oncoproteína de Ras deve ser submetido à farnesilação do resíduo de cisteína localizado num tetrapéptido de terminal carboxílico. Portanto, tem-se sugerido que os inibidores da enzima que cataliza esta modificação, a farnesil-proteína-transferase, são agentes anticancerígenos para os tumores para cuja transformação a Ras contribui. As formas mutadas, oncogénicas, são frequentemente encontradas em muitos cancros dos seres humanos, mais notavelmente em mais de 50% dos carcinomas do cólon e do pâncreas (Kohl *et al.*, *Science*, Vol. 260, 1834 a 1837, 1993).

Sumário da Invenção

Esta invenção refere-se a compostos da fórmula:



IA



IB

onde R^1 é hidrogénio, cloro, fluoro, bromo ou iodo, ciano, hidroxi, nitro, trifluorometilo, $-NHR^5$, $-NR^5R^5$, R^5 , $-OR^5$ ou $-S(O)_m-R^5$;

R^2 é $-(CH_2)_n-Y$ ou $-OCOR^5$;

R^3 é 4-, 3-, ou 2-piridilo, pirimidilo, pirazinilo, 2-fluoro-4-piridilo ou 3-fluoro-4-piridilo;

R^4 é 1-adamantilo ou 2-adamantilo;

Y é hidrogénio, hidroxi, amino, ciano, $-NHR^5$, $-NR^5R^5$, $-NHCOR^5$, $-NHCO_2R^5$, halo, OR^5 , $-S(O)_mR^5$, $-CO_2H$, $-CO_2R^5$, $-CONR^5R^5$, $-CONHR^5$, $-CONH_2$, $-COR^5$, $-CH=CHCO_2R^5$, $-OCOR^5$, fenilo, fenilo substituído por W , $-C=CCO_2R^5$, $-CH=CHR^5$ ou $-C=CR^5$;

cada R^5 é, independentemente, alquil(C_1-C_4) linear ou ramificado, fenilo ou benzilo, onde o referido fenilo e a porção fenilo do referido benzilo podem, opcionalmente, ser substituídas por halo, hidroxi, nitro, ciano, amino, alquil(C_1-C_4) linear ou ramificado, alcoxi(C_1-C_4) linear ou ramificado, fenilo, benzilo, alquil(C_1-C_4)amino, di[alquil(C_1-C_4)]amino, ou $-S(O)_m$ -alquil(C_1-C_4) linear ou ramificado;

cada W é, independentemente, halo, R⁵, hidroxi, OR⁵, nitro, amino, -NHR⁵, -NR⁵R⁵, ciano, ou -S(O)_m-R⁵;

m é 0, 1 ou 2;

n é 1 a 7;

E¹ e E² são seleccionados, independentemente, a partir de hidrogénio, halo, alquil(C₁-C₃), hidroxi, alcoxi(C₁-C₃), nitro, trifluorometilo, ciano, amino, alquil(C₁-C₃)amino e di[alquil(C₁-C₄)]amino;

Het' e Het'' são, independentemente, seleccionados a partir do grupo consistindo em anéis heterocíclicos de 6 membros compreendendo um anel carbocíclico de 6 membros onde cada um, de entre um e quatro, dos seus átomos de carbono é substituído por um átomo de azoto, opcionalmente substituídos com um substituinte seleccionado a partir de alquil(C₁-C₃), halo, hidroxi, alcoxi(C₁-C₃), amino, alquil(C₁-C₃)amino, e di[alquil(C₁-C₃)]amino;

e seus sais farmacêuticamente aceitáveis.

Modelos de realização mais específicos desta invenção incluem o seguinte:

(a) compostos da fórmula IA onde R³ é 4-piridilo, 4-pirimidilo ou 2-fluoro-4-piridilo;

(b) compostos da fórmula IA onde R² é -(CH₂)_nY;

(c) compostos da fórmula IA onde R^2 é $-(CH_2)_nY$ e n é um número inteiro de 1 a 5;

(d) compostos da fórmula IA ou IB onde cada um de R^1 , E^1 e E^2 é hidrogénio; e

(e) compostos da fórmula IA onde R^2 é $-(CH_2)_n-Y$, R^1 é 4-piridilo, 4-pirimidilo ou 2-fluoro-4-piridilo, R^5 é alquil(C_1-C_2) e Y é $-CO_2R^5$, ciano, $-CONHR^5$, $-CH=CHCO_2R^5$ ou $-OCOR^5$.

Outros modelos de realização mais específicos desta invenção referem-se a compostos da fórmula IA onde os grupos R^5 são diferentes de um grupo fenilo ou benzilo que seja substituído por um grupo quer fenilo quer benzilo. Outros modelos de realização mais específicos desta invenção referem-se a compostos da fórmula IA onde os grupos R^5 são diferentes de fenilo ou de benzilo substituído ou insubstituído.

Esta invenção também se refere a um método de inibir o desenvolvimento anormal de células num mamífero, incluindo um ser humano, compreendendo a administração ao referido mamífero de uma quantidade eficaz para inibir a farnesil-proteína-transferase de um composto de fórmula IA ou IB, como atrás definidas, ou um sal farmacologicamente aceitável desse composto.

Esta invenção também se refere a um método de inibir o anormal desenvolvimento celular num mamífero, incluindo um ser humano, compreendendo a administração ao referido mamífero de uma quantidade eficaz de um

composto de fórmula IA ou IB, como atrás definidas, ou um sal farmacêuticamente aceitável desse composto, para inibir o desenvolvimento celular anormal.

Esta invenção também se refere a uma composição farmacêutica para inibir o desenvolvimento anormal de células num mamífero, incluindo um ser humano, compreendendo uma quantidade eficaz de um composto de fórmula IA ou IB, como atrás definidas, ou um sal farmacêuticamente aceitável desse composto, para inibir a farnesil-proteína-transferase, e um suporte farmacêuticamente aceitável.

Esta invenção também se refere a uma composição farmacêutica para inibir o desenvolvimento anormal de células num mamífero, incluindo um ser humano, compreendendo e administrando ao referido mamífero uma quantidade eficaz de um composto de fórmula IA ou IB, como atrás definidas, ou um sal farmacêuticamente aceitável desse composto, para inibir o anormal desenvolvimento celular, e um suporte farmacêuticamente aceitável.

Tal como é aqui usado, "desenvolvimento celular anormal" refere-se ao desenvolvimento celular que é independente dos mecanismos reguladores normais (por exemplo, perda da inibição de contacto). Isto inclui o desenvolvimento anormal de: (1) células tumorais (tumores) exprimindo um oncogénio Ras activado; (2) células tumorais em que a proteína Ras é activada como resultado de mutação oncogénica noutra gene; e (3) células benignas e malignas de outras doenças proliferativas em que ocorre activação aberrante da Ras.

Exemplos dessas doenças proliferativas benignas são a psoríase, a hipertrofia benigna da próstata e a restinose.

O termo "alquilo", tal como aqui é usado, salvo indicação em contrário, inclui radicais de hidrocarboneto monovalente saturados tendo porções cíclicas lineares, ramificadas ou cíclicas, ou combinações das mesmas.

O termo "halo", tal como aqui é usado, refere-se a cloro, fluoro, bromo ou iodo.

Os compostos de fórmulas IA e IB que são básicos por natureza são capazes de formar uma grande variedade de sais com vários ácidos inorgânicos e orgânicos. Os ácidos que podem ser usados para preparar sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis desses compostos de fórmulas IA e IB que são básicos por natureza são os que formam sais de adição de ácido não-tóxicos, isto é, sais contendo aniões farmacologicamente aceitáveis, como os sais de hidrocloreto, hidrobrometo, hidro-iodeto, nitrato, sulfato, bissulfato, fosfato, fosfato ácido, isonicotinato, acetato, lactato, salicilato, citrato, citrato ácido, tartarato, pantotenato, bitartarato, ascorbato, succinato, maleato, gentissinato, fumarato, gluconato, glucoronato, sacarato, formato, benzoato, glutamato, metanossulfonato, etanossulfonato, benzenossulfonato, p-toluenossulfonato e pamoato [isto é, 1,1'-metileno-bis-(2-hidroxi-3-naftoato)].

Os compostos de fórmulas IA e IB atrás referidos podem conter centros quirais e, portanto, podem existir em diferentes formas enantioméricas. Esta invenção refere-se a todos os isómeros ópticos e outros estereo-isómeros de compostos das fórmulas IA e IB, bem como racémicos e outras misturas desses isómeros.

Entre os doentes que podem ser tratados com compostos da fórmula

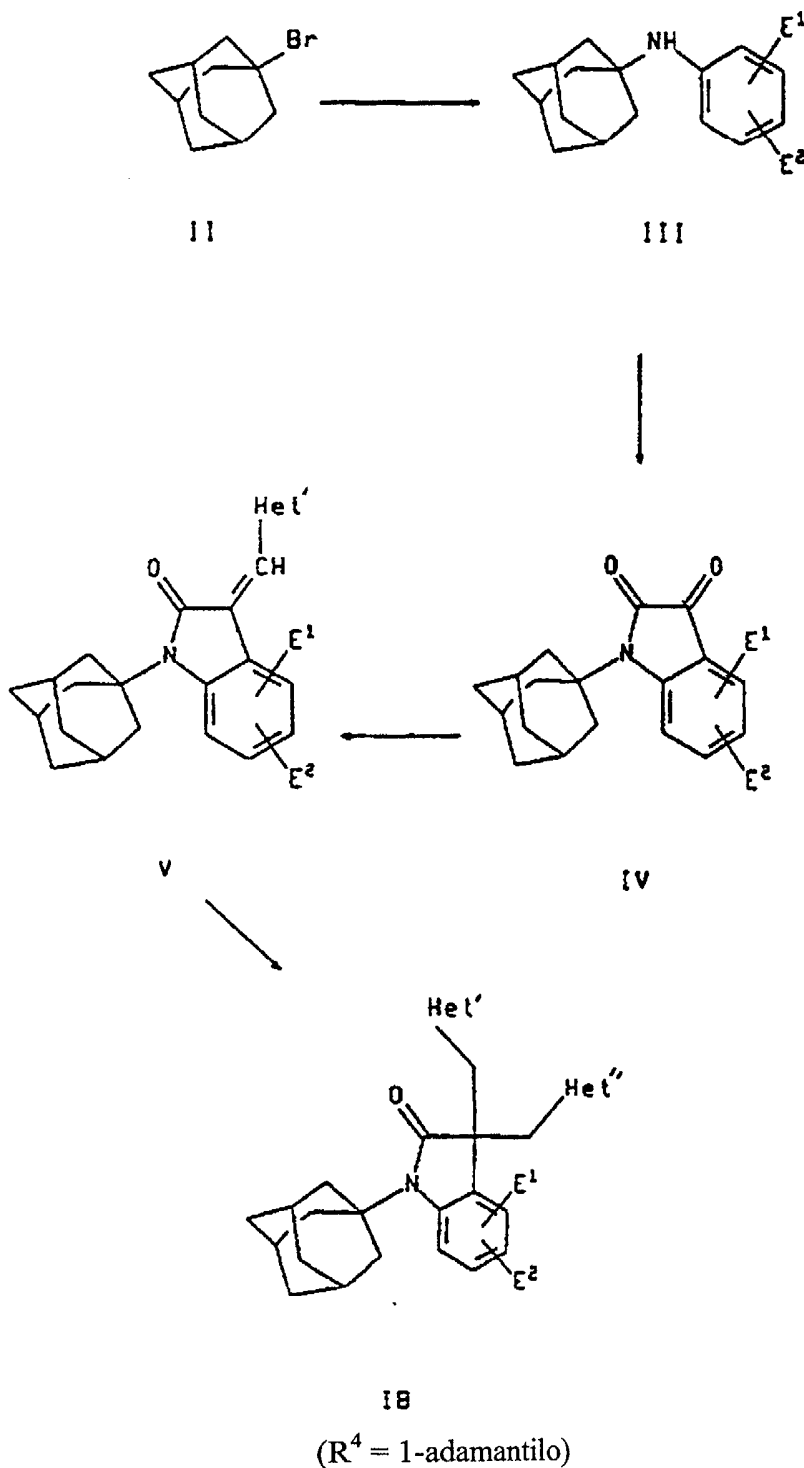
IA ou IB de acordo com os métodos desta invenção incluem-se, por exemplo, os pacientes a quem foi diagnosticado cancro do pulmão, cancro nos ossos, cancro no pâncreas, cancro na pele, cancro na cabeça e pescoço, melanoma cutâneo ou intra-ocular, cancro no útero, cancro no ovário, cancro no recto, cancro na região anal, cancro no estômago, cancro no cólon, cancro na mama, tumores ginecológicos (por exemplo, sarcomas uterinos, carcinoma das trompas de falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma da cérvix, carcinoma da vagina ou carcinoma da vulva), Doença de Hodgkin, cancro no esófago, cancro no intestino delgado, cancro no sistema endócrino (por exemplo, cancro na tiróide, paratiróide ou glândulas supra-renais), sarcomas em tecidos moles, cancro na uretra, cancro no pénis, cancro na próstata, leucemia crónica ou aguda, tumores sólidos de infância, linfomas linfocíticos, cancro na bexiga, cancro no rim ou ureteres (por exemplo, carcinoma das células renais, carcinoma da pélvis renal), ou neoplasmas do sistema nervoso central (por exemplo, linfoma de CNS primário, tumores no eixo espinal, gliomas no tronco cerebral ou adenomas na pituitária)

Entre os doentes que podem ser tratados com compostos de fórmula IA ou IB de acordo com os métodos desta invenção incluem-se também os doentes que padecem de um desenvolvimento celular anormal, como atrás definido.

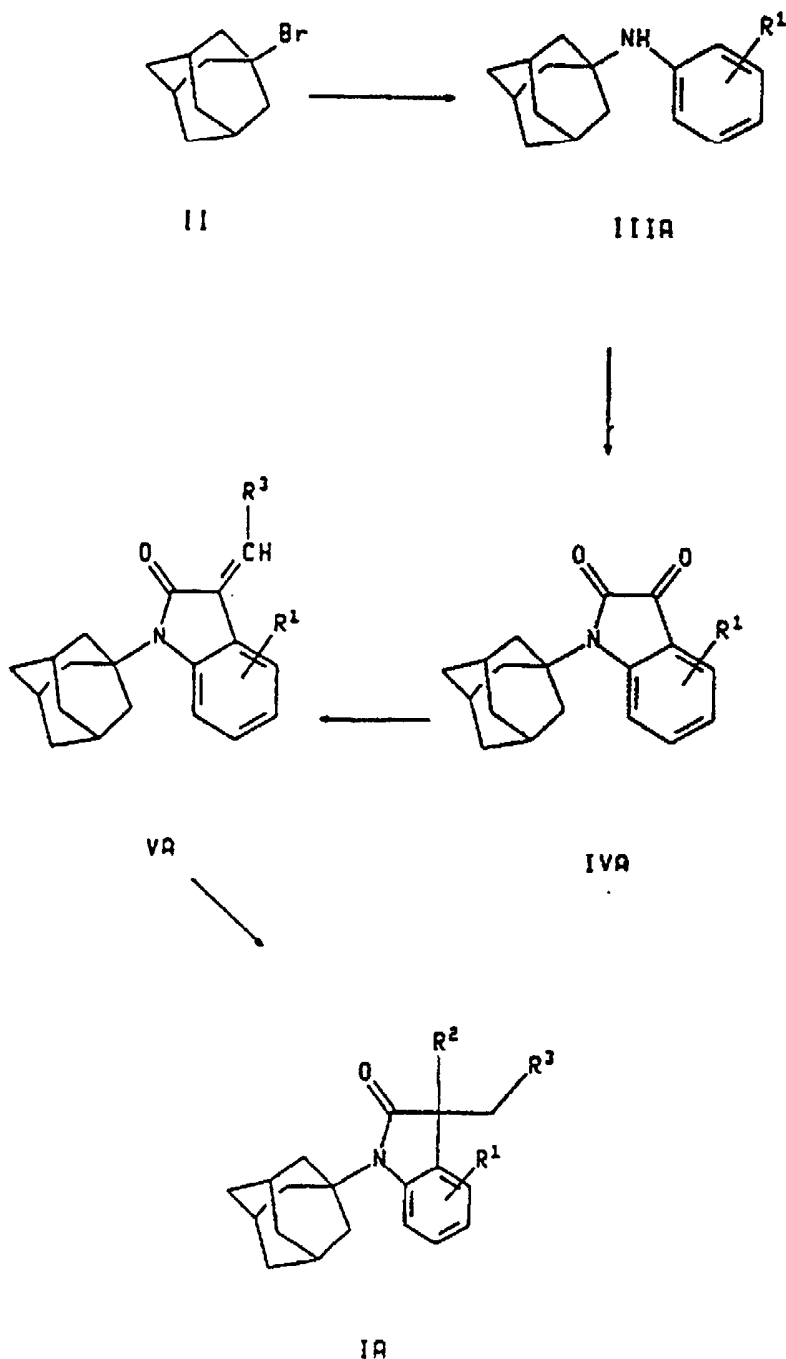
Descrição Pormenorizada da Invenção

A preparação de compostos de fórmulas IA e IB está descrita a seguir. Nos esquemas de reacção e argumentação que se seguem, Y, W, R¹, R², R³, R⁴, R⁵, E¹, E², Het' e Het'' são como atrás definidos.

Esquema 1



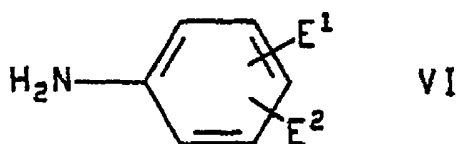
Esquema 2



(R⁴ = 1-adamantilo)

O esquema 1 ilustra a síntese de compostos de fórmula IB onde R^4 = 1-adamantilo. Os compostos de fórmula IB onde R^4 é 2-adamantilo podem ser preparados pelo mesmo processo começando com o análogo de 2-adamantilo do composto II.

Relativamente ao Esquema 1, o 1-bromoadamantilo (fórmula II) é reagido com anilina ou com um derivado de anilina de fórmula



para formar o derivado de anilina substituído por adamantilo de fórmula III. Esta reacção é geralmente efectuada de forma limpa a uma temperatura de cerca de 150°C a cerca de 250°C, preferivelmente a cerca de 200°C. O composto de fórmula III é então reagido com cloreto de oxalilo para formar a benzopirrolidina substituída de fórmula IV. Tipicamente, esta reacção é efectuada num solvente aprótico como benzeno ou tolueno, preferivelmente tolueno, a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 80°C, preferivelmente cerca de 65°C.

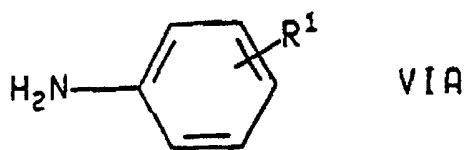
A reacção do resultante composto de fórmula IV com um composto da fórmula CH_3-Het' numa mistura de ácido acético/anidrido acético produz o correspondente composto de fórmula V. A temperatura desta reacção pode ir de cerca de 100°C a cerca de 160°C e, preferivelmente, é de cerca de 140°C.

O composto de fórmula V assim formado pode ser convertido no desejado composto de fórmula IB pelo seguinte processo de dois passos. Primeiro, o composto de fórmula V é reagido com um agente de redução como boro-hidreto de triacetoxi de sódio ou boro-hidreto de sódio em metanol ou

ctanol, preferivelmente boro-hidreto de sódio em metanol, a uma temperatura de cerca de 0°C até cerca de 30°C, preferivelmente a cerca de 5°C, para reduzir a ligação dupla carbono-carbono da cadeia lateral Het'-CH=. Então, o substituinte Het''-CH₂ é adicionado in situ, ou depois de isolar o produto da reacção atrás referida, fazendo reagir a mistura de reacção atrás referida, ou o produto isolado, consoante o caso, com Het''-CH₂X, onde X é um grupo separável apropriado como cloro ou bromo, na presença de uma base forte como hidróxido de potássio em metanol ou hidreto de sódio quer em tetra-hidrofurano (THF), éter ou dimetoxi-etano (DME), preferivelmente hidróxido de potássio em metanol ou hidreto de sódio em THF. Esta reacção é tipicamente efectuada a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 80°C. Preferivelmente, a temperatura de reacção vai de cerca de 20°C a cerca de 30°C. Se a reacção com Het-CH₂X for efectuada in situ, é útil adicionar hidróxido de potássio à mistura, como solubilizante.

O Esquema 2 ilustra a síntese de compostos da fórmula IA onde R⁴ é 1-adamantilo. Os correspondentes compostos onde R⁴ é 1-adamantilo podem ser preparados da mesma maneira começando com o análogo 2-adamantilo do composto II.

Relativamente ao Esquema 2, os compostos tendo fórmulas IIA, IVA e VA podem ser preparados como atrás descritos para a formação de compostos tendo as fórmulas III, IV e V, respectivamente, com a excepção de que o reagente de fórmula VI é substituído por um composto de fórmula



e o reagente de fórmula metil-Het' é substituído por um composto da fórmula CH_2R^3 .

O desejado produto de fórmula IA pode então ser formado como segue. O composto de fórmula VA é, em primeiro lugar, reagido com bis(trimetilsilil)amida de potássio em THF a uma temperatura entre cerca de -70°C e cerca de 60°C, preferivelmente a cerca de 0°C. Então, depois de agitar durante cerca de 30 minutos, é adicionado um composto de fórmula R^1X , onde X é um grupo separável apropriado (por exemplo, cloreto ou brometo), e deixa-se que a mistura de reacção aqueça até cerca de temperatura ambiente.

O Pedido de Patente Mundial WO 93/14085, atrás referido e aqui incorporado como referência na sua totalidade, descreve um método de preparar compostos que diferem dos da fórmula IA pelo facto de não existir nenhum substituinte de adamantilo no azoto do anel.

O Pedido de Patente dos Estados Unidos 4.876.259, também atrás referido e aqui incorporado como referência na sua totalidade, descreve métodos de sintetizar compostos que diferem dos da fórmula IM pelo facto de não haver nenhum substituinte de adamantilo no azoto do anel.

Os materiais de partida usados nos processos dos Esquemas 1 e 2 são, quer conhecidos na literatura quer comercialmente disponíveis.

Os compostos das fórmulas IA e IB que são básicos por natureza são capazes de formar uma grande variedade de diferentes sais com vários ácidos inorgânicos e orgânicos. Embora esses sais devam ser farmacologicamente

aceitáveis para administração a animais, é muitas vezes desejável, na prática, isolar inicialmente o composto de fórmula I, IA e IB a partir da mistura de reacção como um sal farmacologicamente inaceitável e, então, voltar simplesmente a convertê-lo no composto de base livre tratando-o com um reagente alcalino e, subsequentemente, converter esta base livre num sal de adição de ácido farmacologicamente aceitável. Os sais de adição de ácido dos compostos de base desta invenção são prontamente preparados pelo tratamento do composto de base com uma quantidade substancialmente equivalente do ácido mineral ou orgânico escolhido num meio solvente aquoso ou num solvente orgânico adequado como metanol ou etanol. Depois de evaporar o solvente cuidadosamente, o sal sólido desejado é obtido prontamente. O sal de ácido desejado pode também ser precipitado a partir de um soluto da base livre num solvente orgânico, adicionando ao soluto um ácido mineral ou orgânico apropriado.

Os compostos das fórmulas IA e IB exibem actividade como inibidores da farnesilação da Ras e são úteis no tratamento do cancro e na inibição do anormal desenvolvimento celular em mamíferos, incluindo os seres humanos.

Entre os pacientes que podem ser tratados com compostos de fórmulas IA ou IB de acordo com os métodos desta invenção incluem-se, por exemplo, os pacientes a quem foi diagnosticado cancro no pulmão, cancro nos ossos, cancro no pâncreas, cancro na pele, melanoma cutâneo ou intra-ocular, cancro no útero, cancro no ovário, cancro no recto, cancro na região anal, cancro no estômago, cancro no cólon, cancro na mama, tumores ginecológicos (por exemplo, sarcomas do útero, carcinoma das trompas de falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma da cérvix, carcinoma da vagina ou carcinoma da vulva),

Doença de Hodgkin, cancro no esófago, cancro no intestino delgado, cancro no sistema endócrino, (por exemplo, cancro na tiróide, paratiróide ou glândulas supra-renais), sarcomas de tecidos moles, cancro na uretra, cancro no pênis, cancro na próstata, leucemia crónica ou aguda, tumores sólidos de infância, linfomas linfocíticos, cancro na bexiga, cancro no rim ou nos ureteres (por exemplo, carcinoma das células renais, carcinoma da pélvis renal), ou neoplasmas do sistema nervoso central (por exemplo, linfoma de CNS primário, tumores no eixo espinal, gliomas no tronco cerebral ou adenomas na pituitária).

Os compostos de fórmulas IA e IB e seus sais farmacologicamente aceitáveis (a que doravante nos referiremos, colectivamente, como "compostos terapêuticos") podem ser administrados oralmente, transdermicamente (por exemplo, pelo uso de um adesivo), parentericamente ou topicamente. É preferida a administração oral. Em geral, os compostos de fórmula I e os seus sais farmacologicamente aceitáveis são, o mais desejavelmente, administrados em doses que vão de cerca de 1,0 mg até cerca de 500 mg por dia, preferivelmente entre cerca de 1 e cerca de 100 mg por dia em doses únicas ou divididas (isto é, múltiplas). Os compostos das fórmulas IA e IB e os seus sais farmacologicamente aceitáveis serão habitualmente administrados em doses diárias que vão de cerca de 0,01 a cerca de 10 mg por kg de peso corporal por dia, em doses únicas ou divididas. Podem ocorrer variações dependendo do peso e estado da pessoa a ser tratada e da particular via de administração escolhida. Em certos casos, níveis de doseamento abaixo do limite inferior da gama atrás referida podem ser mais do que adequados, ao passo que, noutros casos, doses ainda maiores podem ser utilizadas sem provocarem quaisquer efeitos secundários prejudiciais, desde que essas doses maiores sejam primeiro divididas em várias pequenas doses para administração ao longo do dia.

Os compostos terapêuticos podem ser administrados sozinhos ou em combinação com suportes farmacologicamente aceitáveis ou diluentes, por qualquer das duas vias previamente indicadas, e essa administração pode ser efectuada em doses únicas ou múltiplas. Mais particularmente, os novos compostos terapêuticos desta invenção podem ser administrados numa grande variedade de diferentes formas de doseamento, isto é, podem ser combinados com vários suportes inertes farmacologicamente aceitáveis na forma de comprimidos, cápsulas, pastilhas, trociscos, rebuçados, pós, pulverizações, cremes, pomadas, supositórios, geleias, géis, pastas, loções, unguentos, elixires, xaropes e afins. Esses suportes incluem diluentes sólidos ou enchimentos, meios aquosos estéreis e vários solventes orgânicos não-tóxicos, etc. Além disso, as composições farmacêuticas podem ser adequadamente adoptadas e/ou aromatzadas.

Para administração oral, comprimidos contendo vários excipientes como celulose microcristalina, citrato de sódio, carbonato de cálcio, fosfato de dicálcio e glicina podem ser utilizados ao mesmo tempo que vários desintegrantes como amido (e, preferivelmente, amido de milho, batata ou tapioca), ácido alginico e certos silicatos complexos juntamente com ligantes de granulação como polivinilpirrolidona, sacarose, gelatina e acácia. Adicionalmente, agentes de lubrificação como estearato de magnésio, lauril-sulfato de sódio e talco são frequentemente muito úteis no fabrico de comprimidos. Composições sólidas de tipo similar podem também ser utilizadas como enchimentos em cápsulas de gelatina; entre os materiais preferidos para estes fins também se incluem a lactose, ou açúcar de leite, bem como polietileno-glicóis de elevado peso molecular. Quando se desejem suspensões aquosas e/ou elixires para

administração oral, o ingrediente activo pode ser combinado com vários agentes adoçantes ou aromatizantes, matéria de coloração ou corantes e, se se desejar, também agentes de emulsão e/ou de suspensão, juntamente com diluentes como água, etanol, propileno-glicol, glicarina e suas várias combinações afins.

Para administração parentérica, podem utilizar-se solutos de um composto terapêutico em óleo de gergelim ou de amendoim ou em propileno-glicol aquoso. Os solutos aquosos deveriam, se necessário, ser adequadamente tamponados e, em primeiro lugar, deve fazer-se com que o diluente líquido se torne isotónico. Estes solutos aquosos são adequados para injeções intravenosas. Os solutos oleosos são adequados para injeções intra-articulares, intramusculares e subcutâneas. A preparação de todos estes solutos sob condições estéreis é prontamente conseguida por técnicas farmacêuticas padrão bem conhecidas dos especialistas na técnica.

Adicionalmente, também é possível administrar os compostos terapêuticos topicamente e isto pode ser efectuado preferivelmente por meio de cremes, geleias, géis, pastas, unguentos e afins, de acordo com a prática farmacêutica padrão.

A actividade dos compostos terapêuticos como inibidores da farnesilação da ras pode ser determinada pela sua capacidade, em relação a um controlo, para inibir a farnesil-transferase de ras in vitro. Este processo está descrito a seguir.

Uma preparação bruta de uma farnesil-transferase (Ftase) humana, compreendendo a fracção citosólica de tecido cerebral homogeneizado, é

utilizada para efectuar o escrutínio de compostos num formato de teste em 96 cavidades. A fracção citosólica é preparada por meio da homogeneização de cerca de 40 gramas de tecido fresco em 100 ml de tampão de sacarose/MgCl₂/EDTA (utilizando um homogeneizador Dounce; 10-15 batidas), centrifugando os homogenados a 1000 gramas durante 10 minutos a 4G, re-centrifugando o sobrenadante a 17.000 gramas durante 15 minutos a 4G e recolhendo, então, o resultante sobrenadante. Este sobrenadante é diluído para conter uma concentração final de 50 mM Tris HCl (pH 7,5), 5 mN DTT, 0,2 M KCl, 20 μM ZnCl₂, 1 mM PMSF e re-centrifugado a 178.000 gramas durante 90 minutos a 4G. O sobrenadante, designado por "Ftase bruta" foi testado para se determinar a concentração em proteína, dividido em alíquotas e armazenado a -70°C.

O teste utilizado para medir a inibição in vitro da Ftase humana é uma modificação do método descrito por Amersham LifeScience para usar o seu estojo ("kit") (TRKQ 7010) de Ensaio de Proximidade por Cintilação (EPC) da Farnesil-transferase (3H). A actividade da enzima de Ftase é determinada num volume de 100 μl contendo 50 mM de N-(etil 2-hidroxi) piperazina-N'-(ácido 2-etano-sulfónico) (HEPES), pH 7,5, 30 mM de MgCl₂, 20 uM de KCl, 5 mM de Na₂HPO₄, 5mM de ditioneitol (DTT), 0,01% de Triton X-100, 5% de dimetil-sulfóxido (DMSO), 20 μg de Ftase bruta, 0,12 μM de pirofosfato de [3H]-farnesilo ([3H]-FPP; 36000 dpm/pmole, Amersham LifeScience), e 0,2 μM de péptido KTKCVIS de Ras biotinilada (Bt-KTKCVIS) que é N-terminalmente biotinilado no seu grupo amino alfa e foi sintetizado e purificado por HPLC em câmara. A reacção é iniciada por adição da enzima e terminada por adição de EDTA (fornecida como o reagente STOP no estojo ("kit") TRKQ 7010) depois de uma incubação de 45 minutos a 37°C. O Bt-KTKCVIS prenilado e não

prenilado é capturado pela adição de 10 μ l de pérolas de SPA revestidas com esteptavidina (TRKQ 7010) por cavidade e incubando a mistura de reacção durante 30 minutos a temperatura ambiente. A quantidade de radioactividade ligada às pérolas de SPA é determinada pelo uso de um contador de placa MicroBeta 1450. Sob estas condições de ensaio, a actividade da enzima é linear relativamente às concentrações do aceitador do grupo prenilo, Bt-KTKCVIS e Ftase bruta, mas saturante relativamente ao dador de prenilo, FPF. O tempo de reacção do ensaio também está na gama linear.

Os compostos de teste são rotineiramente dissolvidos em 100% de DMSO. A inibição da actividade da farnesil-transferase é determinada pelo cálculo da incorporação percentual de farnesil tritilado na presença do composto de teste contra a sua incorporação nas cavidades de controlo (ausência de inibidor). Os valores de CI_{50} , ou seja, a concentração necessária para produzir metade da farnesilação máxima de Bt-KTKCVIS, é determinada a partir das respostas à dose obtidas.

EXEMPLO 1

1-Adamantil-1-il-3,3-bis-piridin-4-ilmetil-1,3-di-hidro-indol-2-ona

A. N-1-Adamantilanilina

Sob uma atmosfera de azoto (N_2) combinou-se 10,0 g (46,5 mmol) de 1-bromoadamantano e 20 ml de anilina. A reacção foi agitada durante 20 horas a 200°C e foi então arrefecida e fraccionada sobre sílica gel usando hexano:acetato de etilo (EtOAc) a 6:1 para produzir, após concentração *in vacuo* e refraccionação usando tolueno, 5,65 g (54%) de N-1-adamantilanilina.

^1H RMN (CDCl_3) 1,60-1,70 (m-6H), 1,80-1,90 (m-6H), 2,05-2,15 (m-3H), 3,00-3,40 (bs-1H), 6,70-6,80 (m-3H), 7,10-7,20 (m-2H).

^{13}C RMN (CDCl_3) 29,64, 36,38, 43,37, 52,16, 119,02, 199,08, 128,62, 145,86.

B. 1-Adamantilisatina

Sob uma atmosfera de N_2 adicionou-se 1,97 g (15,6 mmol) de cloreto de oxalilo a 3 ml de tolueno seco que foi arrefecido a 0°C . A este soluto foi adicionado 3,55 g (15,6 mmol) de N-1-adamantilanilina em tolueno (8 ml). Deixou-se a reacção a ser agitada durante 30 min. a 0°C e, então, foi aquecida a 85°C durante 3 horas. Adicionou-se mais solvente (10 ml) e manteve-se a reacção a 65°C durante 72 horas. O solvente foi removido e deixou-se o resíduo a agitar a 160°C durante 5 horas. Deixou-se que a mistura de reacção bruta arrefecesse e cromatografou-se sobre sílica gel usando hexano:EtOAc a 6:1 para produzir o produto bruto que foi triturado com éter isopropílico (IPE) para produzir 164 mg (4,4%) de 1-adamantilisatina combinada com produto contaminado com quantidades significativas de impurezas.

^1H RMN (CDCl_3) 1,70-1,80 (m-6H), 2,20-2,25 (m-3H), 2,50-2,60 (m-6H), 7,00-7,70 (m-6H).

^{13}C RMN (CDCl_3) 29,78, 36,14, 40,07, 61,26, 115,62, 118,96, 122,87, 125,51, 137,42, 152,15.

C. 1-Adamantil-1-il-3-piridin-4-imetil-1,3-di-hidro-indol-2-ona

Sob uma atmosfera de N₂ adicionou-se 164 mg (0,567 mmol) de 1-adamantilisatina a 2 ml de ácido acético glacial. A suspensão foi aquecida num banho de óleo. Adicionou-se 4-picolina (0,091 ml, 0,94 mmol) seguida de anidrido acético (0,094 ml, 1,00 mmol) e deixou-se a solução a agitar a 140°C durante 18 horas. A mistura de reacção foi arrefecida e temperada com água. Adicionou-se EtOAc e fez-se com que a camada aquosa passasse a ser básica com bicarbonato de sódio (NaHCO₂). A camada orgânica foi lavada com água seguida por salmoura e foi então seca sobre sulfato de magnésio, filtrada e concentrada in vacuo para produzir um produto bruto que foi purificado sobre sílica gel usando EtOAc:hexano a 1:1 para produzir 54 mg de 1-adamantilisatina de partida e 108 mg (52% da desejada 1-adamantil-1-il-3-piridin-4-ilmetil-1,3-di-hidro-indol-2-ona como uma mistura de isómeros geométricos.

¹H RMN (CDCl₃) 1,65-1,85 (m-6H), 2,20-2,35 (m-3H), 2,50-2,62 (m-6H), 6,70-7,90 (m-9H), 8,70-8,82 (m-1H).

¹³C RMN (CDCl₃) 29,70, 36,09, 39,99, 60,32, 113,75, 113,97, 119,58, 120,94, 121,46, 122,81, 122,87, 124,76, 129,46, 129,63, 131,06, 143,60, 148,79, 150,00.

D. 1-Adamantil-1-il-3,3-bis-piridin-4-ilmetil-1,3-di-hidro-indol-2-ona

A um soluto de metanol (8 ml) a 0-5°C sob uma atmosfera de N₂ contendo 1-adamantil-1-il-3-piridin-4-ilmetil-1,3-di-hidro-indol-2-ona (100 mg,

0,28 mmol) adicionou-se 17 mg (0,45 mmol) de boro-hidreto de sódio (NaBH_4). Deixou-se a mistura de reacção a agitar durante 45 minutos; nessa altura, adicionou-se 1 ml de água (H_2O) seguida por 73 mg (1,12 mmol) de hidróxido de potássio (KOH) em H_2O . Passados 2-3 minutos, adicionou-se hidrocloreto de cloreto de 4-picolil (49,5 mg, 3 mmol) e deixou-se a reacção a agitar por mais 15 minutos. Adicionou-se tetra-hidrofurano (THF) (2 ml) para ajudar a solubilizar os reagentes. Passada 1 hora, a mistura de reacção foi concentrada até aproximadamente 5 ml, adicionou-se mais THF e deixou-se a reacção a agitar durante 16 horas. A mistura de reacção foi então concentrada in vacuo e recolhida em EtOAc (50 mls). O extracto orgânico foi lavado com água (3X) e então com salmoura e foi então seco sobre sulfato de magnésio, concentrado in vacuo e purificado sobre sílica gel usando EtOAc para produzir 47 mg (38%) da desejada 1-adamantil-1-il-3,3-bis-piridin-4-ilmetil-1,3-di-hidro-indol-2-ona.

^1H RMN (CDCl_3) 1,58-1,62 (m-6H), 1,95-2,10 (m-9H), 3,14(q-4H: JAB=12,5 Hz), 8,70-8,40 (m-8H), 8,20-8,32 (m-4H).

^{13}C RMN (CDCl_3) 29,70, 36,09, 39,99, 60,32, 113,75, 113,97, 119,58, 120,94.

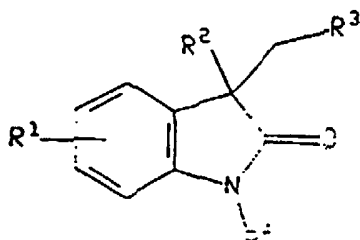
Lisboa, 12 de Setembro de 2001

Alberto Canelas

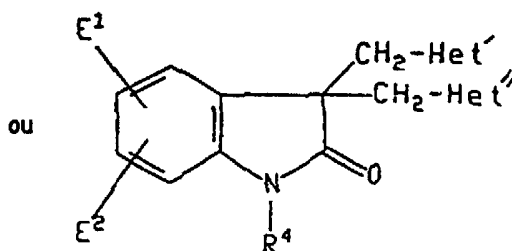
ALBERTO CANELAS
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA

REIVINDICAÇÕES

1. Um composto de fórmula



IA



IB

onde R¹ é hidrogénio, cloro, fluoro, bromo ou iodo, ciano, hidroxi, nitro, trifluorometilo, -NHR⁵, -NR⁵R⁵, R⁵, -OR⁶ ou -S(O)_m-R⁵;

R² é -(CH₂)_n-Y ou -OCOR⁵;

R³ é 4-, 3-, ou 2-piridilo, pirimidilo, pirazinilo, 2fluoro-4-piridilo ou 3-fluoro-4-piridilo;

R⁴ é 1-adamantilo ou 2-adamantilo;

Y é hidrogénio, hidroxi, amino, ciano, NHR⁵, -NR⁵R⁵, -NHCOR⁵, -NHCO₂R⁵, halo, OR⁵, -S(O)_mR⁵, -CO₂H, -CO₂R⁵, -CONR⁵R⁵, -CONHR⁵, -CONH₂, -COR⁵, -CH=CHCO₂R⁵, -OCOR⁵, fenilo, fenilo substituído por W, -C=CCO₂R⁵, -CH=CHR⁵ ou -C=CR⁵;

cada R⁵ é, independentemente, alquil(C₁-C₄) linear ou ramificado, fenilo ou benzilo, onde o referido fenilo e a porção fenilo do referido benzilo

podem, opcionalmente, ser substituídas por halo, hidróxi, nitro, ciano, amino, alquil(C₁-C₄) linear ou ramificado, alcoxi(C₁-C₄) linear ou ramificado, fenilo, benzilo, alquil(C₁-C₄)amino di[alquil(C₁-C₄)]amino, ou -S(O)_m-alquil(C₁-C₄) linear ou ramificado;

cada W é, independentemente, halo, R⁵, hidróxi, OR⁵, nitro, amino, -NHR⁵, -NR⁵R⁵, ciano, ou -S(O)_m-R⁵;

m é 0, 1 ou 2;

n é 1 a 7;

E¹ e E² são seleccionados, independentemente, a partir de hidrogénio, halo, alquil(C₁-C₄), hidróxi, alcoxi(C₁-C₃), nitro, trifluorometilo, ciano, amino, alquil(C₁-C₃)amino e di[alquil(C₁-C₃)]amino;

Het¹ e Het² são, independentemente, seleccionados a partir do grupo consistindo em anéis heterocíclicos de 6 membros compreendendo um anel carbocíclico de 6 membros onde cada um, de entre um e quatro, dos seus átomos de carbono é substituído por um átomo de azoto, opcionalmente substituídos por um substituinte seleccionado a partir de alquil(C₁-C₃), halo, hidróxi, alcoxi(C₁-C₃), amino, alquil(C₁-C₃)amino, e di[alquil(C₁-C₃)]amino;

ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo.

2. O composto 1-adamantil-1-il-3,3-bis-piridin-4-ilmetil-1,3-di-hidro-indol-2-ona.

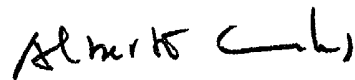
3. Uma composição farmacêutica para inibir o desenvolvi-

mento celular anormal num mamífero compreendendo um composto de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2 e um suporte farmacologicamente aceitável.

4. O uso de um composto como reivindicado na reivindicação 1 para a preparação de um medicamento para tratar o cancro num mamífero.

5. O uso, de acordo com a reivindicação 4, onde o referido medicamento se destina ao tratamento do cancro na mama, cancro nos ossos, cancro no pulmão, cancro no pâncreas, cancro na pele, cancro na próstata ou cancro no cólon.

Lisboa, 12 de Setembro de 2001



ALBERTO CANELAS
Agente Oficial da Propriedade Industrial
RUA VICTOR CORDON, 14
1200 LISBOA