



República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) PI 0715196-9 A2



* B R P I 0 7 1 5 1 9 6 A 2 *

(22) Data de Depósito: 20/07/2007

(43) Data da Publicação: 12/11/2013

(RPI 2236)

(51) *Int.Cl.:*

A61K 31/553

A61P 43/00

(54) Título: USO DE UM COMPOSTO

(57) Resumo:

(30) Prioridade Unionista: 19/07/2007 US 11/880063,
21/07/2006 US 60/832627

(73) Titular(es): Cephalon, Inc

(72) Inventor(es): Bruce A. Ruggeri, Pawel Dobrzanski

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler &
Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007016513 de
20/07/2007

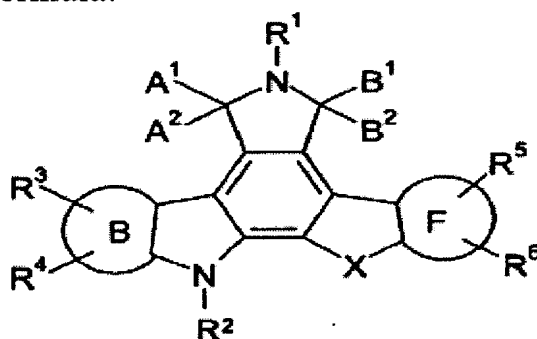
(87) Publicação Internacional: WO 2008/011174 de
24/01/2008

REIVINDICAÇÕES

1. Uso de um composto, que é um inibidor JAK2, caracterizado pelo fato de ser para produzir um medicamento para tratar distúrbios mieloproliferativos.

5 2. Uso de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato do inibidor JAK2 ser um pirrolocarbazol fundido.

3. Uso de um composto, caracterizado pelo fato de ser para produzir um medicamento para tratar distúrbios mieloproliferativos, em que o dito composto tem a fórmula:



10 ou um estereoisômero ou forma de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,
em que:

os anéis B e F, independentemente, are fenila ou heteroarila;

15 R^1 é independentemente H; alquila; arila; arilalquila; heteroarila; heteroarilalquila; $-COR^9$; $-OR^{10}$; $-CONR^7R^8$; $-NR^7R^8$; $-(CH_2)_pNR^7R^8$; $-(CH_2)_pOR^{10}$; $-O(CH_2)_pOR^{10}$; ou $-O(CH_2)_pNR^7R^8$;

R^2 é independentemente H; $-SO_2R^9$; $-CO_2R^9$; $-COR^9$; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 to 8 carbonos; alquinila tendo 2 a 8 carbonos; ou um monossacarídeo tendo 5 a 7 carbonos,

20 em que cada grupo hidroxila do monossacarídeo, independentemente, é opcionalmente substituído por uma alquila tendo 1 a 4 carbonos, alquilcarbonilóxi tendo 2 a 5 carbonos ou alcóxi tendo 1 a 4 carbonos; e

em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são

opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

em que, quando X for CHR^{16} ou NR^{16} , então R^2 e R^{16} podem
opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via
suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são
5 opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} , respectivamente; e a posição 3 do
furano de ligação é dissubstituída por R^{17} e R^{18} ;

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; arila; heteroarila;
F; Cl; Br; I; $-CN$; $-CF_3$; $-NO_2$; $-OR^{10}$; $(CH_2)_pOR^{10}$; $-O(CH_2)_pNR^7R^8$; $-OCOR^9$;
 $-OCONHR^9$; $-CH_2OR^{14}$; $-NR^7R^8$; $-NR^{10}COR^9$; $-NR^{10}CO_2R^9$; $-NR^{10}CONR^7R^8$;
10 $-S(O)_yR^n$; $-CO_2R^9$; $-COR^9$; $-CONR^7R^8$; $-CHO$; $-CH=NOR^{11}$; $-CH=NR^9$; $-$
 $CH=NNR^{12}R^{13}$; $-(CH_2)_pS(O)_yR^9$; $-CH_2SR^{15}$; $-CH_2S(O)_yR^{14}$; $-(CH_2)_pNR^7R^8$; $-$
 $(CH_2)_pNHR^{14}$; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 a 8 carbonos;
ou alquinila tendo 2 a 8 carbonos;

em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são cada um
15 opcional e independentemente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

X é:

alquilenos tendo 1 a 3 carbonos opcionalmente substituídos por
pelo menos um de OH, =O, =NOR¹¹, OR¹¹, $-OCOR^9$, $-OCONR^7R^8$, $-$
 $O(CH_2)_pNR^7R^8$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, arila, arilalquila, heteroarila, $-SO_2R^9$; $-$
20 CO_2R^9 , $-COR^9$, alquila tendo 1 a 8 carbonos, alquenila tendo 2 a 8 carbonos,
alquinila tendo 2 a 8 carbonos, ou um monossacarídeo tendo 5 a 7 carbonos,

em que cada grupo hidroxila do monossacarídeo,
independentemente, é opcionalmente substituído por uma alquila tendo 1 a 4
carbonos, alquilcarbonilóxi tendo 2 a 5 carbonos ou alcóxi tendo 1 a 4
25 carbonos; e

em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são
opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

$-O-$; $-S(O)_y-$; $N(R^{16})$; CHR^{16} ; $-CH_2Z-$; $-Z-CH_2-$; ou
 $-CH_2ZCH_2-$;

em que Z is $C(OR^{11}XR^{11})$, O, S, $C(=O)$, $C(=NOR^{11})$, ou NR^{11} ;

em que quando X for CHR^{16} ou NR^{16} , então R^2 e R^{16} podem
 5 opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via
 suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são
 5 opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} , respectivamente; e a posição 3 do
 furano de ligação é dissubstituída por R^{17} e R^{18} ;

A^1 e A^2 , independentemente, são H, $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, ou $-N(R^{11})_2$;
 ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=O$, $=S$, ou $=NR^{11}$;

B^1 e B^2 independentemente, são H, $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, ou $-N(R^{11})_2$;
 10 ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=O$, $=S$, ou $=NR^{11}$;

com a condição de que pelo menos um do par de A^1 e A^2 , ou
 B^1 e B^2 sejam combinados para formar $=O$;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4
 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma
 15 heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou
 heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 to 4 carbonos,
 20 arila tendo 6 to 10 carbonos, ou heteroarila;

R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 to
 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados,
 formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o
 25 grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

R^{15} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos;

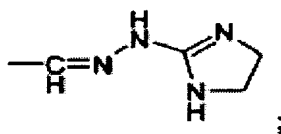
R^{16} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos,
 alquenila tendo 2 a 8 carbonos, alquinila tendo 2 a 8 carbonos, arila, ou
 heteroarila; em que os grupos alquila, alquenila, alquinila, arila ou heteroarila

são cada um opcional e independentemente substituídos por um a três grupos R^{27} ; ou quando X for CHR^{16} ou NR^{16} , então R^2 e R^{16} podem opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} , respectivamente; e a posição 3 do furano de ligação é dissubstituída por R^{17} e R^{18} ;

R^{17} é independentemente OH, O-n-alquila tendo 1 a 6 carbonos, ou O-acila tendo 2 a 6 carbonos;

R^{18} é independentemente H; alquila tendo 1 a 4 carbonos;
10 $CONHC_6H_5$; CH_2Y ,

em que Y é OR^{19} , SOR^{20} , $NR^{21}R^{22}$, ou SR^{23} ; N_3 ; CO_2R^{15} ; S-Glc; $CONR^{24}R^{25}$; $CH=NNHCONH_2$; $CONHOR^{10}$; $CH=NOR^{10}$; $CH=NNHC(=NH)NH_2$;



$CH=NH(R^{26})_2$; ou $CH_2NHCONHR^{16}$; ou

15 R^{17} e R^{18} podem opcionalmente ser combinados entre si para formar $-CH_2NHCO_2-$, $-CH_2OC(CHA)_2O-$, $=O$, ou $-CH_2N(CH_3)CO_2-$;

R^{19} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou acila tendo 2 a 5 carbonos;

R^{20} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou
20 um grupo heterocicloalquila incluindo um átomo de nitrogênio;

R^{21} e R^{22} , independentemente, são H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, Pro, Ser, Gly, Lys, ou acila tendo 2 a 5 carbonos, com a condição de que somente um de R^{21} e R^{22} é Pro, Ser, Gly, Lys ou acila;

R^{23} é independentemente uma arila, alquila tendo 1 a 4
25 carbonos, ou um grupo heterocicloalquila que inclui um átomo de nitrogênio;

R^{24} e R^{25} , independentemente, são H; alquila tendo 1 a 6 carbonos; fenila; ou hidroxialquila de 1-6 carbonos; ou, juntos com o

nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{26} é independentemente arila;

R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -
 5 NO₂; -OR¹⁰; -O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; O-tetraidropirânica; -
 NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸; -NHC(HNH)NH₂; -
 NR¹⁰SO₂R⁹; -S(O)_xR¹; -CO₂R⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -COR⁹; -CH₂OR⁷; -
 CH=NNR¹²R¹³; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH=NNHCH(N=NH)NH₂; -
 SO₂NR¹²R¹³; -P(=O)(OR¹¹)₂; ou -OR¹⁴;

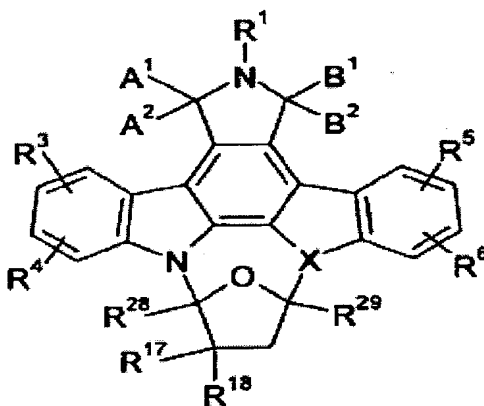
10 R^{28} é independentemente alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, -
 (CH₂)_pOR¹⁰, - (CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

R^{29} é independentemente H, alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, -
 15 (CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

p é um inteiro de 1 a 4; e

Y é 0, 1 ou 2.

4. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato do composto ter a estrutura:



20 ou um estereoisômero ou forma de sal farmacologicamente aceitável do mesmo,
 em que:

R^1 é independentemente H; alquila; fenila; arilalquila tendo 7 to 10 carbonos; heteroarila de 5 a 6 membros; heteroarilalquila; $-\text{COR}^9$; $-\text{OR}^{10}$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; ou $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$;

- 5 R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; fenila; heteroarila de 5 a 6 membros; F; Cl; Br; I; $-\text{CN}$; CF_3 ; $-\text{NO}_2$; $-\text{OR}^{10}$; $(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{OCOR}^9$; $-\text{OCONHR}^9$; $-\text{CH}_2\text{OR}^{14}$; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^{10}\text{COR}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{11}$; $-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{COR}^9$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{CHO}$; $-\text{CH}=\text{NOR}^{11}$; $-\text{CH}=\text{NR}^9$; $-\text{CH}=\text{NNR}^{12}\text{R}^{13}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$; $-\text{CH}_2\text{SR}^{15}$; $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{14}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NHR}^{14}$; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 a 8 carbonos; ou alquinila tendo 2 a 8 carbonos;

em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

X é $-\text{CH}-$ ou N;

- 15 A^1 e A^2 , independentemente, são H, $-\text{OR}^{11}$, $-\text{SR}^{11}$, ou $-\text{N}(\text{R}^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente isto é $=\text{O}$, $=\text{S}$, ou $=\text{NR}^{11}$;

B^1 e B^2 independentemente, são H, $-\text{OR}^{11}$, $-\text{SR}^{11}$, ou $-\text{N}(\text{R}^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=\text{O}$, $=\text{S}$, ou $=\text{NR}^{11}$;

- com a condição de que pelo menos um do par de A^1 e A^2 , ou B^1 e B^2 seja combinado para formar $=\text{O}$;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

- 25 R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila tendo 6 to 10 carbonos, ou heteroarila;

R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 a 10

carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

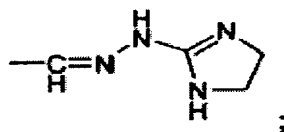
R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

5 R^{15} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{16} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{17} é independentemente OH, O-n-alquila tendo 1 a 6 carbonos, ou O-acila tendo 2 a 6 carbonos;

10 R^{18} é independentemente H; alquila tendo 1 a 4 carbonos; CONHC_6H_5 ; CH_2Y , em que Y é OR^{19} , SOR^{20} , $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, ou SR^{23} ; N_3 ; CO_2R^{15} ; S-Glc; $\text{CONR}^{24}\text{R}^{25}$; CH=NNHCONH_2 ; CONHOR^{10} ; CH=NOR^{10} ; CH=NNHC(=NH)NH_2 ;



$\text{CH=NN(R}^{26})_2$; ou $\text{CH}_2\text{NHCONHR}^{16}$; ou

15 R^{17} e R^{18} são opcionalmente combinados entre si para formar - $\text{CH}_2\text{NHCO}_2^-$, - $\text{CH}_2\text{OC(CH}_3)_2\text{O}^-$, =O, ou - $\text{CH}_2\text{N(CH}_3)_2\text{CO}_2^-$;

R^{19} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou acila tendo 2 a 5 carbonos;

20 R^{20} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou um grupo heterocicloalquila incluindo um átomo de nitrogênio;

R^{21} e R^{22} , independentemente, são H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, Pro, Ser, Gly, Lys, ou acila tendo 2 a 5 carbonos, com a condição de que somente um de R^{21} e R^{22} seja Pro, Ser, Gly, Lys ou acila;

25 R^{23} é independentemente uma arila, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou um grupo heterocicloalquila que inclui um átomo de nitrogênio;

R^{24} e R^{25} , independentemente, são H; alquila tendo 1 a 6 carbonos; fenila; ou hidroxialquila de 1-6 carbonos; ou, juntos com o

nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{26} é independentemente arila;

R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -
 5 NO_2 ; -OR¹⁰; -O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; O-tetraidropiranila; -
 NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸; -NHC(=NH)NH₂; -
 NR¹⁰SO₂R⁹; -S(O)_xR¹¹; -CO₂R⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -COR⁹; -CH₂OR⁷; -
 CH=NNR¹²R¹³; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH=NNHCH(N=NH)NH₂; -
 SO₂NR¹²R¹³; -PO(OR¹¹)₂; ou -OR¹⁴;

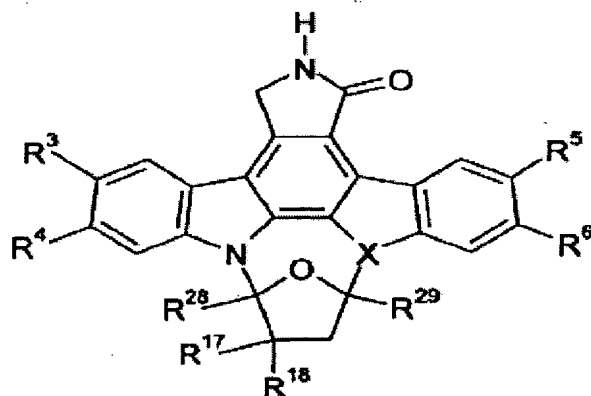
10 R^{28} é independentemente alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, -
 (CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

R^{29} é independentemente H, alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, -
 15 (CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

p é um inteiro de 1 a 4; e

y é 0, 1 ou 2.

5. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato do composto ter a estrutura:



20 ou um estereoisômero ou forma de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,
 em que:

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; fenila; F; Cl; -

OR^{10} ; $(CH_2)_pOR^{10}$; $-NR^7R^8$; $-CHO$; $-(CH_2)_pNR^7R^8$; ou alquila tendo 1 a 8 carbonos;

em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R^{27} ;

5 X é $-CH-$ ou N;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

10 R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila tendo 6 a 10 carbonos ou heteroarila;

15 R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

20 R^{17} é independentemente OH, O-n-alquila tendo 1 a 6 carbonos, ou O-acila tendo 2 a 6 carbonos;

R^{18} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, $CONHC_6H_5$; CH_2OH ; CH_2OCH_3 ; $CH_2OC(CH_3)_3$; CH_2NH_2 ; CO_2CH_3 ; ou $CONR^{24}R^{25}$;

25 R^{24} e R^{25} , independentemente, são H; alquila tendo 1 a 6 carbonos; fenila; ou hidroxialquila de 1-6 carbonos; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; $-CN$; $-NO_2$; $-OR^{10}$; $-O(CH_2)_pNR^7R^8$; $-OCOR^9$; $-OCONHR^9$; O-tetraidropiranila; -

NR^7R^8 ; $-\text{NR}^{10}\text{COR}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$; $-\text{NR}^{10}\text{SO}_2\text{R}^9$; $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^n$; $-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{CHO}$; $-\text{COR}^9$; $-\text{CH}_2\text{OR}^7$; $-\text{CH}=\text{NNR}^{12}\text{R}^{13}$; $-\text{CH}=\text{NOR}^{11}$; $-\text{CH}=\text{NR}^9$; $-\text{CH}=\text{NNHCH}(\text{N}=\text{NH})\text{NH}_2$; $-\text{SO}_2\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$; $-\text{PO}(\text{OR}^{11})_2$ ou $-\text{OR}^{14}$;

5 R^{28} é independentemente alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, $-(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^7\text{R}^8$, ou $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$;

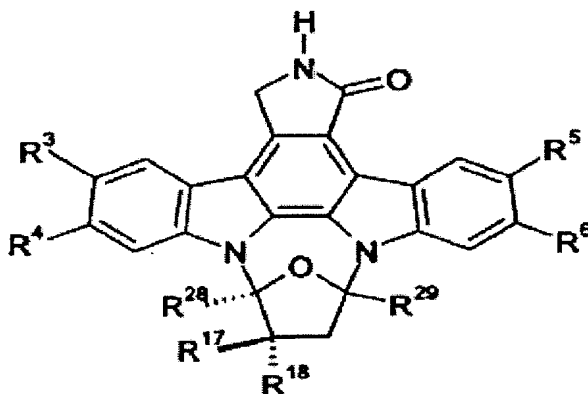
R^{29} é independentemente H, alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos,
10 $(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{OC}(=\text{O})\text{NR}^7\text{R}^8$, ou $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$;

p é um inteiro de 1 a 4; e

y é 0, 1 ou 2.

6. Uso de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de R^3 , R^4 , R^5 e R^6 serem, cada um independentemente, H, fenila, F, Cl,
15 OR^{10} , $-\text{NR}^7\text{R}^8$, $-\text{CHO}$, $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$, ou alquila tendo 1 a 8 carbonos, em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R^{27} .

7. Uso de acordo com a reivindicação 4, caracterizado pelo fato do composto ter a estrutura:



ou um estereoisômero ou forma de sal farmacologicamente aceitável do
20 mesmo, em que:

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H, Cl, alquila de 1-4 carbonos, $-\text{OR}^{10}$, $\text{CH}_2\text{OR}^{10}$, NR^7R^8 , $\text{CH}_2\text{NR}^7\text{R}^8$, ou CONR^7R^8 ;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4

carbonos;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

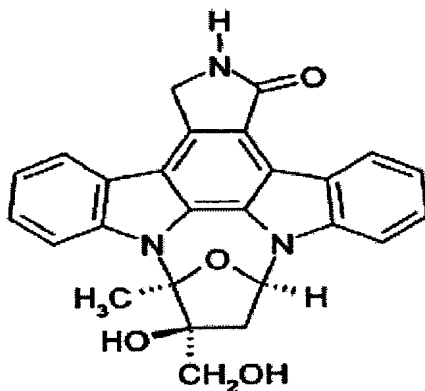
R^{17} é independentemente OH, ou O-n-alquila tendo 1 a 4 carbonos;

5 R^{18} é independentemente H, CH_2OH , CO_2CH_3 , $CO_2CH_2CH_3$, $CO_2CH_2CH_2CH_3$ ou $CO_2CH(CH_3)_2$;

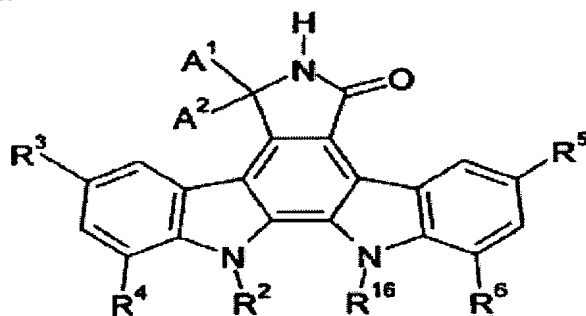
R^{28} é CH_3 ; e

R^{29} é independentemente H ou CH_3 .

8. Uso de acordo com a reivindicação 7, caracterizado pelo
10 fato do composto ter a estrutura:



9. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo
fato de ter a estrutura:



ou um estereoisômero ou forma de sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que:

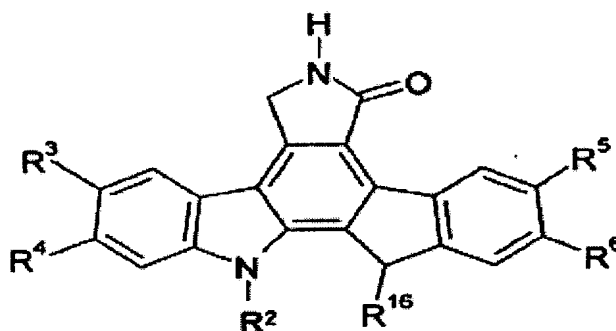
15 (a) R^2 e R^{16} são cada um independentemente selecionados do grupo consistindo de H, alquila de 1 a 6 carbonos, hidroxialquila de 1 a 3 carbonos, e alquenila de 3 a 6 carbonos, com a condição de que tanto R^2 e R^{16}

não sejam H;

(b) A^1 e A^2 são ambos hidrogênio e R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são cada um independentemente H ou até dois deles são F; Cl; Br; I; NO_2 ; CN; OH; NHCONHR^7 em que R^7 is alquila de 1 a 4 carbonos com a condição de que
5 somente um de R^3 , R^4 , R^5 e R^6 seja NHCONHR^7 ; $\text{CH}_2\text{OR}^{10}$; alquila de 1 a 4 carbonos; $\text{CH}_2\text{OCONHC}_2\text{H}_5$; ou NHCO_2CH_3 ; e

(c) em que A^1 e A^2 são ambos combinados entre si para representar O; e R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são cada um hidrogênio.

10. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo
10 fato de ter a estrutura:



ou um estereoisômero ou forma de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

R^2 é independentemente $-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{COR}^9$; alquila tendo 1 a 4 carbonos; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três
15 grupos R^{27} ;

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; fenila; Cl; $-\text{OR}^{10}$; $(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; ou alquila tendo 1 a 6 carbonos;

em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a
três grupos R^{27} ;

20 R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila;

R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterociclila de 5 a 7 membros;

R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

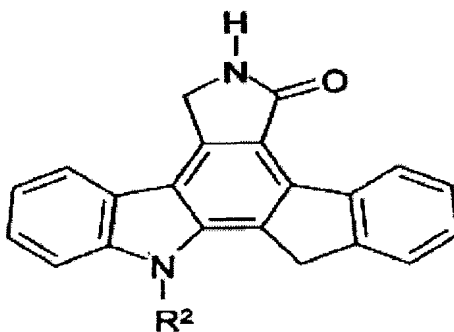
R^{16} é independentemente H, alquila tendo 1 to 4 carbonos;

10 R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -NO₂; -OR¹⁰; -O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; O-tetraidropirani; -NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸; -NHC(=NH)NH₂; -NR¹⁰SO₂R⁹; -S(O)_yR¹¹; -CO₂R⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -COR⁹; -CH₂OR⁷; -CH=NNR¹²R¹³; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH=NNHCH(N=NH)NH₂; -SO₂NR¹²R¹³; -PO(OR¹¹)₂; ou -OR¹⁴;

p é um inteiro de 1 a 4; e

y é O, 1 ou 2.

11. Uso de acordo com a reivindicação 10, caracterizado pelo fato de ter a estrutura:



20 ou um estereoisômero ou forma de sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que:

R^2 é independentemente -CO₂R⁹; -COR⁹; alquila tendo 1 a 4 carbonos; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R^{27} ;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 6 membros, opcionalmente contendo um átomo de nitrogênio no anel adicional;

5 R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou fenila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos;

10 R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

R^{27} é independentemente fenila; heteroarila de 5-6 membros no anel; $-OR^{10}$; $-O(CH_2)_pNR^7R^8$; $-OCOR^9$; $-OCONHR^9$; O-tetraidropiranila; $-NR^7R^8$; $NR^{10}COR^9$; $-NR^{10}CO_2R^9$; $-NR^{10}OONR^7R^8$; $-NR^{10}SO_2R^9$; $-S(O)_yR^{11}$; $-CO_2R^9$; $-CONR^7R^8$; $-COR^9$; $-CH_2OR^7$; ou $-OR^{14}$;

15 p é um inteiro de 1 a 4; e

y é 0, 1 ou 2.

12. Uso de acordo com a reivindicação 3, caracterizado pelo fato de dito distúrbio mieloproliferativo ser selecionado do grupo consistindo de policitemia rubra (PV), trombocitomia essencial (ET), mielofibrose com metaplasia mielóide (MMM), mielofibrose idiopática (CIMF), distúrbios mieloproliferativos desclassificados (uMPDs), síndrome hipereosinofílica (HES) e mastocitose sistêmica (SM).

13. Uso de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de dito distúrbio mieloproliferativo ser selecionado do grupo consistindo de policitemia rubra (PV), trombocitomia essencial (ET), mielofibrose com metaplasia mielóide (MMM), mielofibrose idiopática (CIMF), distúrbios mieloproliferativos desclassificados (uMPDs), síndrome hipereosinofílica (HES) e mastocitose sistêmica.

14. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo

fato do composto ser administrado em uma quantidade de cerca de 0,8 mg/kg de peso corporal a cerca de 1,3 mg/kg de peso corporal por dia.

- 5 15. Uso de acordo com a reivindicação 13, caracterizado pelo fato de o composto ser administrado em uma quantidade de cerca de 60 mg a cerca de 80 mg duas vezes por dia.

“USO DE UM COMPOSTO”

CAMPO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se ao tratamento de distúrbios mieloproliferativos (MPDs) e síndromes mielodisplásticas. Especificamente, a
5 invenção refere-se ao tratamento de MPDs e síndromes mielodisplásticas com um composto que é um inibidor de JAK2 e, em particular, com um composto de pirrolocarbazol fundido.

FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os distúrbios mieloproliferativos (MPDs) são malignidades
10 clonais caracterizadas por superprodução de uma ou mais linhagens hematopoiéticas com uma diferenciação relativamente normal em uma medula óssea hiper celular (BM). Imagina-se que os MPDs originam-se de um único progenitor multipotente ou célula tronco, que domina a BM e o sangue. Os progenitores hematopoiéticos cultivados de pacientes com MPDs exibem
15 alteradas propriedades de crescimento e independência do fator de crescimento. A base molecular para certos MPDs tinha estado não clara até que uma série de recentes relatos identificasse uma única substituição de aminoácidos V617F no domínio da pseudoquinase de JAK2 como uma lesão molecular predominante em policitemia rubra (PV), trombocitemia essencial
20 (ET) e mielofibrose idiopática crônica (CIMF). Esta mutação foi constatada em 75% - 97% dos pacientes com PV e cerca de 40% - 50% de pacientes com ET e CIMF (James et al, 2005, Trends in Molecular Medicine 11, 546-554). Importaneamente, nenhuma outra mutação foi constatada nos domínios autoinibitórios ou da quinase de 85 outras quinases (Levine et al, 2005,
25 Cancer Cell 7, 387-397). Além disso, a mutação V617F foi também identificada em pacientes com síndromes mielodisplásticas (MDS). Com base na estrutura de JAK2 predita, a substituição V617F rompe uma interação auto-inibitória entre os domínios JH2 e da quinase (JH1) da proteína. Conseqüentemente, os mutantes V617F foram constitutivamente ativos e

conferiram independência do fator de crescimento e ativação STAT5 constitutiva quando expressos em células BaF3/EPOR (Levine et al, Cancer Cell 2005, 7, 387-397; Kralovics et al, 2005, N. Engl J. Med. 352, 1779-1790)). Os progenitores eritróides contendo a mutação V6117F cresceram na
 5 ausência de eritropoietina exógena (EPO) e formaram colônias de eritróides endógenos (EEC), uma marca de autenticidade dos MPDs, e a inativação mediada por siRNA de JAK2 reduziu a formação de EEC. Finalmente, camundongos transplantados com células da medula óssea de murinos expressando o mutante V617F, porém não um JAK2 tipo selvagem,
 10 desenvolveram aspectos patológicos estreitamente lembrando PV em humanos, incluindo forte elevação de hemoglobina/hematócrito, leucocitose, hiperplasia de megacariócitos, hematopoiese extramedular resultando em esplenomegalia e mielofibrose da medula óssea (James et al, 2005, Nature 434, 1144-1148; Wernig et al, 2006, Blood. 2006 Fev. 14, [Epub impressão
 15 adiantada]). Clinicamente, a presença da mutação em pacientes com CIMF foi associada com uma doença mais agressiva e significativamente mais fraca sobrevivência (Cam pbell et al, 2006, Blood, 2098-2100).

Há necessidade na técnica de neutralizar o fenótipo associado com o mutante ou JAK2 ativado e tratar doenças mieloproliferativas e
 20 síndromes mielodisplásticas associadas com a ativação de JAK2.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

As tirosinas quinases ligadas a receptor (trk) são proteínas de transmembrana que contêm um domínio de ligação de ligando extracelular, uma seqüência de transmembrana e um domínio de tirosina quinase
 25 citoplásmica. As tirosinas quinases funcionam em transdução de sinal celular. A proliferação, diferenciação, migração, metabolismo e morte programada das células são exemplos de respostas celulares mediadas por tirosina quinase. JAK2 é uma tirosina quinase não-receptora. Verificou-se que os inibidores de JAK2 podem ser usados para tratar distúrbios mieloproliferativos e outras

doenças em que a expressão constitutiva de JAK2 contribui para um estado patológico.

Assim, a invenção provê um método para tratar distúrbios mieloproliferativos e distúrbios relacionados com uma composição contendo um derivativo de pirrolocarbazol fundido.

Os distúrbios mieloproliferativos e distúrbios relacionados, associados com a ativação de JAK2, que podem ser tratados no método da invenção, incluem mas não são limitados a doenças mieloproliferativas, tais como, por exemplo, policitemia rubra (PV), trombocitemia essencial (ET), mielofibrose com metaplasia mielóide (MMM) também chamada mielofibrose idiopática crônica (CIMF), distúrbios mieloproliferativos desclassificados (uMPDs), síndrome hipereosinofílica (HES) e mastocitose sistêmica (SM).

No método da invenção, uma quantidade terapeuticamente eficaz do inibidor JAK2 é administrada ao indivíduo. Para o adulto médio de 70 kg, um regime de dose pode ser, por exemplo, de cerca de 20 a cerca de 120 mg duas vezes por dia. Em algumas formas de realização, a dose para o adulto médio é de cerca de 40 a cerca de 100 mg, duas vezes por dia,. Em outras formas de realização, a dose para o adulto médio é de cerca de 60 a cerca de 80 mg, duas vezes por dia.

No método da invenção, a atividade de certas proteínas é reduzida na presença do derivativo de pirrolocarbazol fundido, em comparação com a ausência do pirrolocarbazol fundido. Estas proteínas incluem mas não são limitadas a JAK2, STAT5, STAT3, SHP2, GAB2, AKT e ERK.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A **Figura 1** mostra inibição da Atividade de JAK2 Quinase por CEP-701.

A **Figura 2** mostra resultados de PCR específica de alelo

(painel 5) e análise de enzima de restrição (painel B), que foram realizadas para confirmar a presença da mutação V617F em células HEL 92. As células K562, que não abrigam esta mutação, serviu como um controle tipo selvagem.

Painel A: Para PCR específica de alelo, iniciadores específicos de mutante geraram um diagnóstico de produto de 203 pb (seta) da mutação; um produto de 364 pb serviu como um controle interno para PCR. M, marcadores de peso Molecular; Alamedas 1 e 2, células HEL 92 mostrando o mutante de 364 pb e os alelos tipo selvagem e o alelo específico de mutante de 203 pb. Alameda 3, células K562 de controle, mostrando somente o alelo tipo selvagem de 364 pb. **Painel B:** Para análise de restrição, um produto PCR abrangendo a mutação V617F foi gerado de DNAs de HEL92 e K562 e digerido com enzima de restrição BsaXI. Produtos PCR Indigeridos (indicados por “-“) e digeridos BsaXI (indicados por “+“) são mostrados M, marcadores de peso molecular. O padrão de restrição predita foi gerado para DNA K562. Duas independentes preparações de DNA foram testadas para cada linhagem de célula.

A **Fig. 3** mostra os efeitos de CEP-701 na sinalização JAK2/STAT em células HEL 92. Células HEL 92 foram incubadas por 24h com CEP-701 a 0,1 μ M, 0,3 μ M, 1,0 μ M e 3.0 μ M, como indicado. Os efeitos na sinalização JAK2/STAT foram avaliados por western blot usando-se anticorpos STAT3 e STAT5 específicos de fosfo, como indicado ou por protocolo de imunoprecipitação/western blot (IP/WB) para JAK2: anticorpo de JAK2 total foi usado para IP e a fosforilação foi avaliada por WB usando-se anticorpo de fosfotirosina. A expressão de Bclxl foi determinada por western blot.

A **Figura 4** mostra os efeitos de CEP-701 no crescimento de células HEL 92. Células HEL 92 foram incubadas com concentrações crescente de CEP-701, como indicado, por 24 h e 48 h. Os efeitos sobre o crescimento celular foram avaliados por ensaio MTS. Experimentos foram

realizados em 10% FCS (Painel A e B) ou sem soro (Painel C e D). O **Painel A** mostra os resultados de uma incubação de 24 horas na presença de 10% de soro de bovino fetal (FBS). O **Painel B** mostra resultados de uma incubação de 48 horas, na presença de 10% FBS. O **Painel C** mostra resultados de uma incubação de 24 horas sem FBS. O **Painel D** mostra resultados de uma incubação de 48 horas sem FBS. Para os Painéis A-D, quantidades crescentes de CEP-701 foram adicionadas para separar culturas (mostrado em barras hachuradas); células não tratadas são mostradas na primeira barra.

A **Figura 5** mostra efeitos de CEP-701 sobre o crescimento de células HEL 92 com composto reabastecido cada 24 horas. As células HEL foram incubadas em 2% FCS com concentrações crescentes de CEP-701, como indicado, por 72 h. CEP-701 foi reabastecido cada 24 h. Os efeitos sobre o crescimento celular foram avaliados por ensaio MTS. Células não tratadas são mostradas na primeira barra.

A **Figura 6** mostra os efeitos de CEP-701 sobre a indução da apoptose em células HEL. Células HEL 92 foram incubadas com concentrações crescentes de CEP-701, como indicado, por 24h, 48 h e 72 h. A indução da apoptose foi analisada por ensaio de liberação de histona/DNA. O **Painel A** mostra um ensaio de 24 h, o **Painel B** mostra um ensaio de 48 horas e o **Painel C** mostra um ensaio de 72 h.

A **Figura 7** mostra a inibição da ativação de STAT5 por CEP-701 em células HEL 92. Células HEL 92 foram incubadas com concentrações crescentes de CEP-701 por 1 h, 1,5 h e 2,5 h, como indicado. Extratos de células integrais foram preparados e os efeitos sobre a fosforilação de STAT5 foram avaliados por western blot usando-se anticorpos específicos. As faixas foram quantificadas e a extensão da fosforilação foi normalizada na quantidade total de STAT5 em uma amostra. Os resultados são mostrados como percentagem da fosforilação STAT5 restante, em comparação com as amostras tratadas por veículo.

A média de 5 experimentos é mostrada na base. Com base em 5 experimentos independentes, a IC₅₀ para inibição STAT5 em células HEL 92 foi determinada ser de cerca de 10 nM.

A **Figura 8** mostra a inibição da ativação de STAT3 por CEP-701 em células HEL 92. Células HEL 92 foram incubadas com crescentes concentrações de CEP-701 por 1 h, 1,5 h e 2,5 h, como indicado. Os extratos integrais de célula foram preparados e os efeitos sobre a fosforilação STAT3 foram avaliados por western blot usando-se anticorpos específicos. As faixas foram quantificadas e a extensão da fosforilação foi normalizada na quantidade total de STAT3 em uma amostra. Os resultados são mostrados como percentagem da fosforilação STAT3 restante, em comparação com amostras tratadas com veículo. A média de 5 experimentos é mostrada no fundo. A IC₅₀ para inibição STAT3 em células HEL 92 é mostrada ser de cerca de 10 nM.

A **Figura 9** mostra os efeitos da inibição humana mediada por α 1-AGP em CEP-701 da atividade de STAT5 em células HEL 92. Células HEL 92 foram incubadas por 1 h com 1,0 mg/ml de α 1-AGP e com concentrações crescentes de CEP-701, como indicado. Extratos de células integrais foram preparados e os efeitos sobre a fosforilação de STAT5 foram avaliados por western blot usando-se anticorpos específicos. As faixas foram quantificadas e a extensão da fosforilação foi normalizada na quantidade total de STAT5 em uma amostra. Os resultados são mostrados como percentagem da fosforilação STAT5 remanescente, em comparação com amostras tratadas com veículo. Co-incubação com 1,0 mg/ml AGP mudou a IC₅₀ para inibição de STAT5 para 3 μ M.

A **Figura 10** mostra os efeitos de CEP-701 (30 mg/kg) administrado subcutaneamente, duas vezes por dia no crescimento de xenoenxertos de tumor HEL 92. **PAINEL A:** crescimento de tumores não tratados é mostrado por quadrados, enquanto os tumores tratados são

mostrados por triângulos. **Painel B:** mostra os tumores excisados não-tratados e tratados.

A **Figura 11** mostra os efeitos de CEP-701 sobre a sinalização JAK2/STAT em xenoenxertos de tumor de HEL 92. Uma única dose de CEP-701 (30 mg/kg) foi administrada subcutaneamente em animais contendo xenoenxertos de tumor HEL 92 e os efeitos na ativação de STAT5 e STAT3 foram avaliados a 0, 1, 2, 4, 8 e 12 horas após administração de CEP-701 por Western blot. As concentrações intratumorais de CEP-701 foram também determinadas.

A **Figura 12** mostra a genotipagem de amostras clínicas quanto à presença da mutação V617F por PCR específica de alelo. Os Pacientes #648 e #650 diagnosticados com mielofibrose idiopática crônica (CIMF) foram testados quanto à mutação V617F por PCR específica de alelo. Os alelos tipo selvagem e mutantes amplificam como um fragmento 364 pb, enquanto o 203 pb, produto PCR específico de mutante, indica a presença da mutação V617F. Também mostrados são os resultados para as células HEL 92 (que contém o alelo mutante) e as K562 tipo selvagem.

A **Figura 13** mostra a genotipagem de amostras clínicas com enzima de restrição BstX1. O produto PCR abrangendo a mutação V617F foi digerido por BstX1, como indicado. SLC é um produto PCR não relacionado com JAK2, contendo sítios BstX1, que servem como um controle da conclusão da digestão.

A **Figura 14** mostra os efeitos de CEP-701 sobre o crescimento de culturas primárias CD34+ derivadas do paciente #648 (ensaio XTT).

Painel A: 24 HORAS. **Painel B:** 48 horas.

A **Figura 15** mostra os efeitos de CEP-701 no crescimento e sobrevivência das culturas primárias CD34+ derivadas do paciente #648. Os progenitores hematopoiéticos CD34+ foram purificados pelo paciente #648 e

cultivados com crescentes concentrações de CEP-701, como indicado. **Painel A:** as células foram tratadas com CEP-701 por 24 h e os efeitos sobre o crescimento celular (células vivas) e apoptose (Anexina V) foram avaliados por análise FACS. **Painel B:** as células tratadas por 24 h com CEP-701 foram diluídas em um meio fresco e cultivadas por 72 h. A contagem celular foi determinada usando-se azul de tripano. T = 0 representa o número de células no início do experimento.

A **Figura 16** mostra os efeitos de CEP-701 na sinalização JAK2/STAT em culturas primárias CD34+ derivadas do Paciente #648. Os progenitores hematopoiéticos CD34+ foram purificados do paciente #648 e cultivados com crescentes concentrações de CEP-701, como indicado, por 1 h. Extratos integrais de célula foram preparados e a expressão e fosforilação de STAT5, STAT3 foi analisada por Western blot, empregando-se anticorpos específicos. Para avaliar a atividade de JAK2, JAK2 foi imunoprecipitado, seguido por um Western blot usando-se anticorpo específico de antifosfotirosina (4G10). Blot foi estirada e ressonada com anticorpo JAK2. Ciclofilina e actina β serviram como controles internos.

A **Figura 17** mostra os efeitos de CEP-701 sobre a ativação de SHP2 e Gab2 e sinalização AKT e MAPK em culturas primárias CD34+ derivadas do Paciente #648. Os progenitores hematopoiéticos CD34+ foram purificados do paciente #648 e cultivados com crescentes concentrações de CEP-701, como indicado, por 1 h. Extratos de célula integral foram preparados e a expressão e fosforilação de várias moléculas de sinalização foram analisadas por western blot empregando-se anticorpos específicos.

Painel A: Os efeitos de CEP-701 sobre a ativação de SHP2 e GAB2 foram avaliados por anticorpos fosfoespecíficos (pSHP2 e pGAB2). Os níveis totais de expressão foram analisados (SHP2 e GAB2). **Painel B:** Os efeitos de CEP-701 sobre sinalização MAPK e AKT foram avaliados empregando-se anticorpos fosfoespecíficos contra AKT (pAKT) e ERK (pERK). Os níveis

totais de expressão foram analisados usando-se anticorpos específicos (AKT e ERK). A actina β serviu como controle interno.

A **Figura 18** mostra os efeitos de 24 h de incubação com CEP-701 na sinalização STAT5 em culturas primárias CD34+ derivadas do Paciente #648. Os progenitores hematopoiéticos CD34+ foram purificados do paciente #648 e cultivados com crescentes concentrações de CEP-701, como indicado, por 24 h. Extratos integrais de célula foram preparados e a expressão e fosforilação de STAT5 e expressão de Bclxl foi analisada por western blot, usando-se anticorpos específicos. A expressão da β actina e ciclofilina serviu como controle interno.

DESCRIÇÃO DETALHADA DAS FORMAS DE REALIZAÇÃO ILUSTRATIVAS

A presente invenção refere-se a métodos para o tratamento de vários distúrbios ou síndromes associados com a ativação de JAK2 com derivados de pirrolocarbazol fundidos biologicamente ativos. Em certas formas de realização, os distúrbios e/ou síndromes incluem, por exemplo, distúrbios mieloproliferativos (MPDs) e síndromes mielodisplásticas. Entre os derivados de pirrolocarbazol fundidos, úteis para tratamento dos distúrbios e/ou síndromes estão os derivados de indolocarbazol e indenocarbazol. Mais especificamente, a invenção refere-se a tratamento dos MPDs e síndromes mielodisplásticas e outros distúrbios relacionados, associados com a ativação de JAK2 com um indolocarbazol. Os derivados de pirrolocarbazol úteis em tais distúrbios são conhecidos na técnica e podem ser preparados em numerosas maneiras pelo artífice hábil, incluindo, por exemplo, Patente U.S. No. 4.923.986 de Murakata, et al.; 5.705.511 de Hudkins, et al.; 5.808.060 de Hudkins, et al; Patente U.S. No. 6.127.401 de Singh, et al; 6.841.567 Patente U.S. No. de Hudkins, et al.; 6.630.500 de Gingrich, et al.; 5.756.494 de Lewis, et al.; 5.468.872 de Glicksman, et al.; 5.516.771 de Dionne, et al.; 6.306.849 de Hudkins, et al.; e 6.093.713 de Hudkins, et al.; cujas descrições

são incorporadas aqui por referência em suas totalidades. Em certas formas de realização, os materiais de partida da preparação dos indolocarbazóis, por exemplo, K-252a e KT-5556, são opticamente ativos. O uso de K252a ou KT5556 como material de partida na preparação dos compostos úteis nos métodos de tratamento aqui descritos pode resultar em transferência parcial ou total da atividade óptica para os derivados de pirrolocarbazol fundidos desejados.

Como empregado acima e por toda a descrição, os seguintes termos, a menos que de outro modo indicado, serão entendidos como tendo os seguintes significados.

Como aqui usado, “cerca de” refere-se a uma faixa de valores $\pm 10\%$ de um valor especificado. Por exemplo, “cerca de 20” inclui $\pm 10\%$ de 20 ou de 18 a 22, inclusive.

Como aqui usado, “alquila” refere-se a um hidrocarboneto opcionalmente substituído, saturado, reto ou ramificado, tendo de cerca de 1 a cerca de 8 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono nele), preferivelmente com de cerca de 1 a cerca de 4 átomos de carbono (referido aqui como “alquila inferior”). Os grupos alquila incluem mas não são limitados a metila, etila, n-propila, isopropila, n-butila, isobutila, t-butila, n-pentila, isopentila, neopentila, n-hexila, isoexila, 3-metilpentila, 2,2- dimetilbutila, e 2,3-dimetilbutila.

Como aqui usado, “alquenila” refere-se a um grupo alquila opcionalmente substituído, tendo de cerca de 2 a cerca de 10 átomos de carbono, mais preferivelmente tendo de cerca de 2 a cerca de 8 átomos de carbono, e uma ou mais duplas ligações (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono nele), em que alquila é como anteriormente definida.

Como aqui usado, “alquinila” refere-se a um grupo alquila

opcionalmente substituído tendo de cerca de 2 a cerca de 10 átomos de carbono, mais preferivelmente tendo de cerca de 2 a cerca de 8 átomos de carbono, e uma ou mais triplas ligações (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono nele), em que alquila é como anteriormente definida.

Como aqui usado, "arila" refere-se a um sistema de anéis aromáticos, mono, di ou tricíclicos, opcionalmente substituídos, tendo de cerca de 6 a cerca de 14 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono), com de cerca de 6 a cerca de 10 carbonos sendo preferidos. Exemplos não-limitativos incluem, por exemplo, fenila, naftila, antracenila, e fenantrenila.

Como aqui usado, "arilalquila" refere-se a um componente opcionalmente substituído composto de um radical alquila contendo um substituinte arila, em que o componente aralquila tem de cerca de 7 a cerca de 22 átomos de carbono (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de átomos de carbono nele), com de cerca de 7 a cerca de 10 átomos de carbono sendo preferidos. Exemplos não-limitativos incluem, por exemplo, benzila, difenilmetila, trifenilmetila, feniletila, e difeniletila.

Como aqui usado, "heteroarila" refere-se a um sistema de anéis aromáticos opcionalmente substituídos tendo 5 a 14 membros de anel de átomo de carbono em que um ou mais dos membros de anel de átomo de carbono é/são independentemente substituídos por um ou mais heteroátomos. Em certas formas de realização, o heteroátomo é selecionado de S, O, ou N. Grupos heteroarila tendo a total de cerca de 5 a cerca de 14, mais preferivelmente de cerca de 5 a cerca de 6 membros de anel de átomo de carbono e membros de anel de heteroátomo (e todas as combinações e subcombinações de faixas e números específicos de membros de anel de carbono e heteroátomo) são preferidos. Grupos heteroarila exemplificativos incluem mas não são limitados a pirrila, furila, piridila, piridino-N-óxido,

1,2,4-tiadiazolila, pirimidila, tienila, isotiazolila, imidazolila, tetrazolila, pirazinila, pirimidila, quinolila, isoquinolila, tiofenila, benzotienila, isobenzofurila, pirazolila, indolila, purinila, carbazolila, benzimidazolila, e isoxazolila. Os grupos heteroarila podem ser ligados via um carbono ou um heteroátomo ao resto da molécula.

Como aqui usado, "heteroarilalquila" refere-se a um sistema de anéis opcionalmente substituído composto de um radical alquila substituído por heteroarila, em que a heteroarila e alquila são como anteriormente definidos. Exemplos não-limitativos incluem, por exemplo, 2-(1H-pirrol-3-il)etila, 3-piridilmetila, 5-(2H-tetrazolil)metila, e 3-(pirimidin-2-il)-2-metilciclopentanila.

Como aqui usado, os termos "Pro" "Ser" "Gly" "Lys" referem-se aos aminoácidos prolina, serina, glicina, e lisina, respectivamente.

Como aqui usado, o termo "aminoácido" indica uma molécula contendo tanto um grupo amino como um grupo carboxila. Formas de realização de aminoácidos incluem α -aminoácidos; isto é, ácidos carboxílicos de forma geral $\text{HOOC-CH}(\text{NH}_2)\text{-(cadeia lateral)}$. As cadeias laterais de aminoácidos incluem componentes naturalmente ocorrentes e não naturalmente ocorrentes. Cadeias laterais de aminoácido não-naturalmente ocorrentes (isto é, não naturais) são componentes que são usados em lugar de cadeias laterais de aminoácido naturalmente ocorrentes em, por exemplo, análogos de aminoácido. Vide, por exemplo, Lehninger, Biochemistry, segunda edição, Worth Publishers, Inc, 1975. páginas 73-75, incorporado por referência aqui. α -aminoácidos preferidos incluem glicina, alanina, prolina, ácido glutâmico e lisina, tendo a configuração D, a configuração L ou como um racemato.

Como aqui usado, o termo "Glc" refere-se a glicose.

Como aqui usado, o termo "substancialmente enriquecido", quando referindo-se a um estereoisômero ou centro estereoisomérico indica

que pelo menos cerca de 60%, preferivelmente cerca de 70%, mais preferivelmente cerca de 80%, ainda mais preferivelmente cerca de 90% de um estereoisômero ou um centro estereoisomérico predominando na mistura, com pelo menos cerca de 95% de um estereoisômero ou um centro estereoisomérico sendo mesmo mais preferido. Em algumas formas de realização preferidas, o composto é "substancialmente enanciomericamente puro", isto é, pelo menos cerca de 97,5%, mais preferivelmente cerca de 99%, mesmo mais preferivelmente cerca de 99,5% de uma forma estereoisomérica predomina.

10 Como aqui usado, o termo "quantidade eficaz" refere-se a uma quantidade de um composto como descrito aqui que pode ser terapeuticamente eficaz para inibir ou tratar os sintomas de doença, distúrbio ou condição particular. Tais doenças, distúrbios e condições incluem mas não são limitados àquelas condições patológicas associadas com a atividade de JAK2, em que o tratamento compreende, por exemplo, inibir sua atividade contatando-se as células, tecidos ou receptores com compostos da presente invenção. Assim, por exemplo, a expressão "quantidade eficaz", quando usada com relação a compostos da invenção para o tratamento de distúrbios mieloproliferativos, refere-se ao tratamento dos sintomas, doenças, distúrbios e condições tipicamente associados com distúrbios mieloproliferativos.

20 Como aqui usado, "farmaceuticamente aceitável" refere-se àqueles compostos, materiais, composições e/ou formas de dosagem que são, dentro do escopo do julgamento médico saudável, adequados para contato com os tecidos de seres humanos e animais, sem excessiva toxicidade, irritação, resposta alérgica ou outras complicações problemáticas, comensurado com uma razoável relação benefício/risco.

25 Como aqui usado, "sais farmaceuticamente aceitáveis" refere-se a derivativos dos compostos descritos, em que o composto precursor é modificado produzindo-se sais ácidos ou básicos deles. Exemplos de sais

farmaceuticamente aceitáveis incluem mas não são limitados a sais ácidos minerais ou orgânicos de resíduos básicos, tais como aminas; sais alcalinos ou orgânicos de resíduos ácidos, tais como ácidos carboxílicos; e similares. Os sais farmaceuticamente aceitáveis incluem sais não-tóxicos convencionais ou os sais de amônio quaternário do composto precursor formado, por exemplo, de ácidos inorgânicos ou orgânicos não-tóxicos. Por exemplo, tais sais não-tóxicos convencionais incluem aqueles derivados de ácidos inorgânicos, tais como clorídrico, bromídrico, sulfúrico, sulfâmico, fosfórico, nítrico e similares; e os sais preparados de ácidos orgânicos tais como acético, propiônico, succínico, glicólico, esteárico, láctico, málico, tartárico, cítrico, ascórbico, pamóico, maleico, hidroximaleico, fenilacético, glutâmico, benzóico, salicílico, sulfanílico, 2-acetoxibenzóico, fumárico, toluenossulfônico, metanossulfônico, etano dissulfônico, oxálico, isetiônico e similares. Estes sais fisiologicamente aceitáveis são preparados por métodos conhecidos na técnica, p. ex., dissolvendo-se as bases de amina livres com um excesso do ácido em álcool aquoso, ou neutralizando-se um ácido carboxílico livre com uma base de material ativo, tal como um hidróxido, ou com uma amina. Os compostos descritos aqui do princípio ao fim podem ser usados ou preparados em formas alternativas. Por exemplo, dependendo dos reagentes, das condições de reação e similares, os compostos descritos aqui podem ser usados ou preparados, por exemplo, como seus sais cloridreto ou tosilato. As formas cristalinas isomórficas, todas as formas quirais e racêmicas, N-óxido, hidratos, solvatos e hidratos de sal ácido são também contempladas para situarem-se dentro do escopo da presente invenção.

Como aqui usado, "hidrato" refere-se a um composto da presente invenção que é associado com água na forma molecular, isto é, em que a ligação H-OH não é dividida e pode ser representada, por exemplo, pela fórmula R^1H_2O , em que R é um composto da presente invenção. Um dado composto pode formar mais do que um hidrato, incluindo, por exemplo,

monoidratos (R^*H_2O) ou poliidratos (RT_nH_2O em que n é um inteiro > 1) incluindo, por exemplo, diidratos (R^*2H_2O), triidratos (R^*3H_2O), e similares, ou semiidratos, tais como, por exemplo, $R^{*n/2}H_2O$, $R^{*n/3}H_2O$, $RT^{*n/4}H_2O$ e similares em que n é um inteiro.

5 Como aqui usado, "solvato" refere-se a um composto da presente invenção que é associado com solvente na forma molecular, isto é, em que o solvente é coordenativamente ligado e pode ser representado, por exemplo, pela fórmula ($R'(\text{solvente})$), em que R é um composto da presente invenção. Um dado composto pode formar mais do que um solvato, incluindo, 10 por exemplo, monossolvatos ($R'(\text{solvente})$) ou polissolvatos ($R^n(\text{solvente})$) em que n é um inteiro > 1) incluindo, por exemplo, dissolvatos ($R^2(\text{solvente})$), trissolvatos ($R^3(\text{solvente})$) e similares, ou semissolvatos, tais como, por exemplo, $R^{n/2}(\text{solvente})$, $R^{n/3}(\text{solvente})$, $R^{n/4}(\text{solvente})$ e similares em que n é um inteiro. Solventes aqui incluem solventes mistos, por 15 exemplo, metanol/água e, como tal, os solvatos podem incorporar um ou mais solventes dentro do solvato.

 Como aqui usado, "hidrato de sal ácido" refere-se a um complexo que pode ser formado através da associação de um composto tendo um ou mais componentes básicos com pelo menos um composto tendo um ou 20 mais componentes ácidos ou através da associação de um composto tendo um ou mais componentes ácidos com pelo menos um composto tendo um ou mais componentes básicos, dito complexo sendo ainda associado com moléculas de água, a fim de formar um hidrato que é como anteriormente definido e R representa o complexo aqui descrito acima.

25 Os compostos aqui descritos do princípio ao fim podem ser usados ou preparados em formas alternativas. Por exemplo, muitos compostos contendo amino podem ser usados ou preparados como um sal de adição de ácido. Com freqüência, tais sais melhoram o isolamento e as propriedades de manuseio do composto. Por exemplo, dependendo dos reagentes, as condições

de reação e similares, os compostos como aqui descritos podem ser usados ou preparados, por exemplo, como seus sais cloridreto ou tosilato. As formas cristalinas isomórficas, todas as formas quirais e racêmicas, N-óxido, hidratos, solvatos e hidratos de sal ácido são também contemplados situarem-se dentro do escopo da presente invenção.

Como aqui usado, “paciente” refere-se a animais, incluindo mamíferos, preferivelmente humanos.

Como aqui usado, “pró-medicação” refere-se a compostos especificamente projetados para maximizar a quantidade de espécie ativa que alcança o desejado sítio de reação, que são eles próprios tipicamente inativos ou minimamente ativos para a atividade desejada, porém através de biotransformação, são convertidos nos metabólitos biologicamente ativos.

Como aqui usado, o termo “estereoisômeros” refere-se a compostos que têm idêntica constituição química, porém diferem com respeito ao arranjo dos átomos ou grupos no espaço.

Como aqui usado, “N-óxido” refere-se a compostos e que o átomo de nitrogênio básico de um anel heteroarila ou amina terciária é oxidado para fornecer um nitrogênio quaternário contendo uma carga formal positiva e um átomo de oxigênio ligado contendo uma carga formal negativa.

Como aqui usados, os termos “tratamento” e “tratando” como aqui usado incluem (p. ex., profilático) tratamento curativo e/ou paliativo.

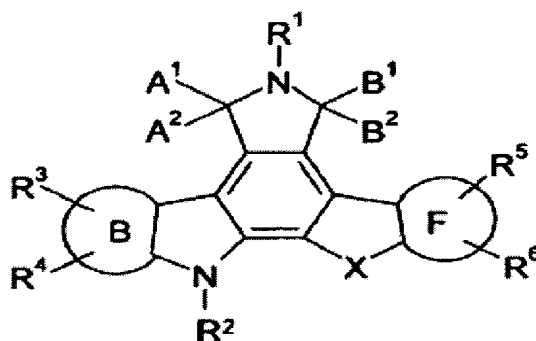
Quando qualquer variável ocorre mais do que uma vez em qualquer constituinte ou em qualquer fórmula, sua definição em cada ocorrência é independente de sua definição em cada outra ocorrência.

Combinações de substituintes e/ou variáveis são permissíveis somente se tais combinações resultarem em compostos estáveis.

Acredita-se que as fórmulas e nomes químicos usados aqui correta e precisamente refletem os compostos químicos subjacentes. Entretanto, a natureza e o valor da presente invenção não depende da correção

teórica destas fórmulas, em todo ou em parte. Assim, entende-se que as fórmulas usadas aqui, bem como os nomes químicos atribuídos aos compostos correspondentemente indicados não se destinam a limitar a invenção de forma alguma, incluindo restringi-la a qualquer forma tautomérica específica ou a qualquer isômero óptico ou geométrico específico, exceto onde tal estereoquímica for claramente definida.

Portanto, em certas formas de realização, a presente invenção é dirigida a métodos de tratar distúrbios mieloproliferativos, compreendendo administrar a um paciente em necessidade dele uma quantidade terapêuticamente eficaz de um inibidor JAK2. Em algumas formas de realização, o inibidor JAK2 é um pirrolocarbazol fundido. Em certas formas de realização, o pirrolocarbazol fundido é um indolocarbazol e em outras formas de realização é um indenocarbazol. Em formas de realização particulares, o pirrolocarbazol fundido tem a estrutura de Fórmula I:



Fórmula I

como um seu estereoisômero ou forma de sal farmaceuticamente aceitável, em que:

os anéis B e F, independentemente, are fenila ou heteroarila;

R^1 é independentemente H; alquila; arila; arilalquila; heteroarila; heteroarilalquila; $-COR^9$; $-OR^{10}$; $-CONR^7R^8$; $-NR^7R^8$; $-(CH_2)_pNR^7R^8$; $-(CH_2)_pOR^{10}$; $-O(CH_2)_pOR^{10}$; ou $-O(CH_2)_pNR^7R^8$;

R^2 é independentemente H; $-SO_2R^9$; $-CO_2R^9$; $-COR^9$; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 to 8 carbonos; alquinila tendo 2 a 8 carbonos; ou um monossacarídeo tendo 5 a 7 carbonos,

em que cada grupo hidroxila do monossacarídeo, independentemente, é opcionalmente substituído por uma alquila tendo 1 a 4 carbonos, alquilcarbonilóxi tendo 2 a 5 carbonos ou alcóxi tendo 1 a 4 carbonos; e

5 em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

em que, quando X for CHR^{16} ou NR^{16} , então R^2 e R^{16} podem opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são
10 opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} respectivamente; e a posição 3 do furano de ligação é dissubstituída por R^{17} e R^{18} ;

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -CF₃; -NO₂; -OR¹⁰; (CH₂)_pOR¹⁰; -O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; -CH₂OR¹⁴; -NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸;
15 -S(O)_yRⁿ; -CO₂R⁹; -COR⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH=NNR¹²R¹³; -(CH₂)_pS(O)_yR⁹; -CH₂SR¹⁵; -CH₂S(O)_yR¹⁴; -(CH₂)_pNR⁷R⁸; -(CH₂)_pNHR¹⁴; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 a 8 carbonos; ou alquinila tendo 2 a 8 carbonos;

em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são cada um
20 opcional e independentemente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

X é: alquilenos tendo 1 a 3 carbonos opcionalmente substituído por pelo menos um de OH, =O, =NOR¹¹, OR¹¹, -OCOR⁹, -OCONR⁷R⁸, -O(CH₂)_pNR⁷R⁸, -O(CH₂)_pOR¹⁰, arila, arilalquila, heteroarila, -SO₂R⁹; -CO₂R⁹, -COR⁹, alquila tendo 1 a 8 carbonos, alquenila tendo 2 a 8 carbonos,
25 alquinila tendo 2 a 8 carbonos, ou um monossacarídeo tendo 5 a 7 carbonos,

em que cada grupo hidroxila do monossacarídeo, independentemente, é opcionalmente substituído por uma alquila tendo 1 a 4 carbonos, alquilcarbonilóxi tendo 2 a 5 carbonos ou alcóxi tendo 1 a 4 carbonos; e

em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

$-O-$; $-S(O)_y-$; $N(R^{16})$; CHR^{16} ; $-CH_2Z-$; $-Z-CH_2-$; ou $-CH_2ZCH_2-$;

;

5 em que Z is $C(OR^{11}XR^{11})$, O, S, $C(=O)$, $C(=NOR^{11})$, ou NR^{11} ;

em que quando X for CHR^{16} ou NR^{16} , então R^2 e R^{16} podem opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} , respectivamente; e a posição 3 do furano de ligação é dissubstituída por R^{17} e R^{18} ;

A^1 e A^2 , independentemente, são H, $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, ou $-N(R^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=O$, $=S$, ou $=NR^{11}$;

B^1 e B^2 independentemente, são H, $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, ou $-N(R^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=O$, $=S$, ou $=NR^{11}$;

15 com a condição de que pelo menos um do par de A^1 e A^2 , ou B^1 e B^2 sejam combinados para formar $=O$;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

20 R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 to 4 carbonos, arila tendo 6 to 10 carbonos, ou heteroarila;

25 R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 to 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

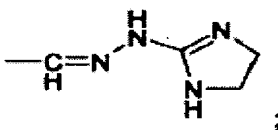
R^{15} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{16} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, alquenila tendo 2 a 8 carbonos, alquinila tendo 2 a 8 carbonos, arila, ou heteroarila; em que os grupos alquila, alquenila, alquinila, arila ou heteroarila
5 são cada um opcional e independentemente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

ou quando X for CHR^{16} ou NR^{16} , então R^2 e R^{16} podem opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são
10 opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} , respectivamente; e a posição 3 do furano de ligação é dissustituída por R^{17} e R^{18} ;

R^{17} é independentemente OH, O-n-alquila tendo 1 a 6 carbonos, ou O-acila tendo 2 a 6 carbonos;

R^{18} é independentemente H; alquila tendo 1 a 4 carbonos;
15 $CONHC_6H_5$; CH_2Y , em que Y é OR^{19} , SOR^{20} , $NR^{21}R^{22}$, ou SR^{23} ; N_3 ; CO_2R^{15} ; S-Glc; $CONR^{24}R^{25}$; $CH=NNHCONH_2$; $CONHOR^{10}$; $CH=NOR^{10}$; $CH=NNHC(=NH)NH_2$;



$CH=NH(R^{26})_2$; ou $CH_2NHCONHR^{16}$; ou

R^{17} e R^{18} podem opcionalmente ser combinados entre si para
20 formar $-CH_2NHCO_2-$, $-CH_2OC(Cha)_2O-$, $=O$, ou $-CH_2N(CH_3)CO_2-$;

R^{19} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou acila tendo 2 a 5 carbonos;

R^{20} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou um grupo heterocicloalquila incluindo um átomo de nitrogênio;

R^{21} e R^{22} , independentemente, são H, alquila tendo 1 a 4
25 carbonos, Pro, Ser, Gly, Lys, ou acila tendo 2 a 5 carbonos, com a condição de que somente um de R^{21} e R^{22} é Pro, Ser, Gly, Lys ou acila;

R^{23} é independentemente uma arila, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou um grupo heterocicloalquila que inclui um átomo de nitrogênio;

R^{24} e R^{25} , independentemente, são H; alquila tendo 1 a 6 carbonos; fenila; ou hidroxialquila de 1-6 carbonos; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{26} é independentemente arila;

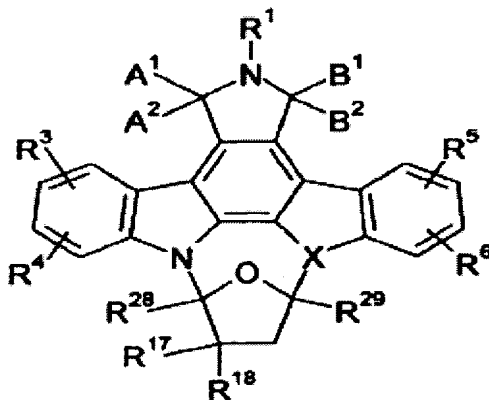
R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -NO₂; -OR¹⁰; -O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; O-tetraidropirânica; -NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸; -NHC(HNH)NH₂; -NR¹⁰SO₂R⁹; -S(O)_xR¹; -CO₂R⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -COR⁹; -CH₂OR⁷; -CH=NNR¹²R¹³; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH=NNHCH(N=NH)NH₂; -SO₂NR¹²R¹³; -P(=O)(OR¹¹)₂; ou -OR¹⁴;

R^{28} é independentemente alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, - (CH₂)_pOR¹⁰, - (CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou - (CH₂)_pNR⁷R⁸;

R^{29} é independentemente H, alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, - (CH₂)_pOR¹⁰, - (CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou - (CH₂)_pNR⁷R⁸;

p é um inteiro de 1 a 4; e Y é 0, 1 ou 2.

Em algumas formas de realização, o pirrolocarbazol fundido tem a estrutura de Fórmula II:



ou um estereoisômero ou forma de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,

em que:

5 R^1 é independentemente H; alquila; fenila; arilalquila tendo 7 to 10 carbonos; heteroarila de 5 a 6 membros; heteroarilalquila; $-\text{COR}^9$; $-\text{OR}^{10}$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; ou $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$;

10 R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; fenila; heteroarila de 5 a 6 membros; F; Cl; Br; I; $-\text{CN}$; CF_3 ; $-\text{NO}_2$; $-\text{OR}^{10}$; $(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{OCOR}^9$; $-\text{OCONHR}^9$; $-\text{CH}_2\text{OR}^{14}$; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^{10}\text{COR}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{S}(\text{O})\text{R}^{11}$; $-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{COR}^9$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{CHO}$; $-\text{CH}=\text{NOR}^{11}$; $-\text{CH}=\text{NR}^9$; $-\text{CH}=\text{NNR}^{12}\text{R}^{13}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{S}(\text{O})_y\text{R}^9$; $-\text{CH}_2\text{SR}^{15}$; $-\text{CH}_2\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{14}$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NHR}^{14}$; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 a 8 carbonos; ou alquinila tendo 2 a 8 carbonos;

15 em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

X é $-\text{CH}-$ ou N;

A^1 e A^2 , independentemente, são H, $-\text{OR}^{11}$, $-\text{SR}^{11}$, ou $-\text{N}(\text{R}^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente isto é $=\text{O}$, $=\text{S}$, ou $=\text{NR}^{11}$;

20 B^1 e B^2 independentemente, são H, $-\text{OR}^{11}$, $-\text{SR}^{11}$, ou $-\text{N}(\text{R}^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=\text{O}$, $=\text{S}$, ou $=\text{NR}^{11}$;

com a condição de que pelo menos um do par de A^1 e A^2 , ou B^1 e B^2 seja combinado para formar $=\text{O}$;

25 R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila tendo 6 to 10 carbonos, ou heteroarila;

R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

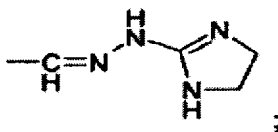
R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

R^{15} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{16} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{17} é independentemente OH, O-n-alquila tendo 1 a 6 carbonos, ou O-acila tendo 2 a 6 carbonos;

R^{18} é independentemente H; alquila tendo 1 a 4 carbonos; CONHC_6H_5 ; CH_2Y , em que Y é OR^{19} , SOR^{20} , $\text{NR}^{21}\text{R}^{22}$, ou SR^{23} ; N_3 ; CO_2R^{15} ; S-Glc; $\text{CONR}^{24}\text{R}^{25}$; $\text{CH}=\text{NNHCONH}_2$; CONHOR^{10} ; $\text{CH}=\text{NOR}^{10}$; $\text{CH}=\text{NNHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$;



$\text{CH}=\text{NN}(\text{R}^{26})_2$; ou $\text{CH}_2\text{NHCONHR}^{16}$; ou

R^{17} e R^{18} são opcionalmente combinados entre si para formar - $\text{CH}_2\text{NHCO}_2^-$, - $\text{CH}_2\text{OC}(\text{CH}_3)_2\text{O}-$, $=\text{O}$, ou - $\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)\text{CO}_2^-$;

R^{19} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou acila tendo 2 a 5 carbonos;

R^{20} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou um grupo heterocicloalquila incluindo um átomo de nitrogênio;

R^{21} e R^{22} , independentemente, são H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, Pro, Ser, Gly, Lys, ou acila tendo 2 a 5 carbonos, com a condição de que somente um de R^{21} e R^{22} seja Pro, Ser, Gly, Lys ou acila;

R^{23} é independentemente uma arila, alquila tendo 1 a 4

carbonos, ou um grupo heterocicloalquila que inclui um átomo de nitrogênio;

R^{24} e R^{25} , independentemente, são H; alquila tendo 1 a 6 carbonos; fenila; ou hidroxialquila de 1-6 carbonos; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{26} é independentemente arila;

R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -NO₂; -OR¹⁰; -O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; O-tetraidropiranila; -NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸; -NHC(=NH)NH₂; -NR¹⁰SO₂R⁹; -S(O)_xR¹¹; -CO₂R⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -COR⁹; -CH₂OR⁷; -CH=NNR¹²R¹³; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH=NNHCH(N=NH)NH₂; -SO₂NR¹²R¹³; -PO(OR¹¹)₂; ou -OR¹⁴;

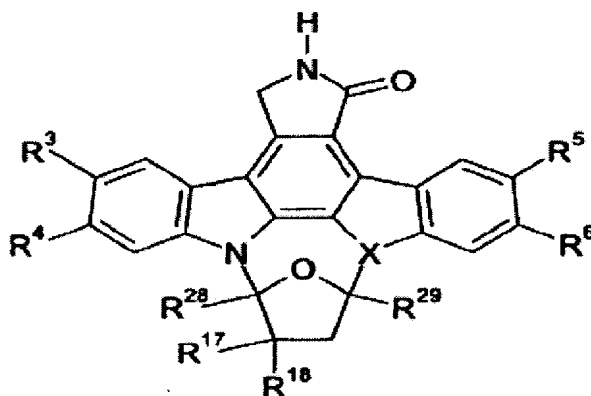
R^{28} é independentemente alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, - (CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

R^{29} é independentemente H, alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, - (CH₂)_pOR¹⁰, - (CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

p é um inteiro de 1 a 4; e

y é 0, 1 ou 2.

Em certas outras formas de realização, o pirrolocarbazol fundido tem a estrutura de Fórmula III:



ou um seu estereoisômero ou sal farmaceuticamente aceitável; em que: R³, R⁴,

R^5 , R^6 , R^{17} , R^{18} , R^{28} , R^{29} e X são como descritos aqui antes para os compostos de Fórmula II. Em algumas formas de realização preferidas, R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 são cada um H.

Em outras formas de realização do método da invenção, o pirrolocarbazol fundido é um composto tendo a estrutura de Fórmula III em que:

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; fenila; F; Cl; -OR¹⁰; (CH₂)_pOR¹⁰; -NR⁷R⁸; -CHO; -(CH₂)_pNR⁷R⁸; ou alquila tendo 1 a 8 carbonos; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R²⁷; X é -CH- ou N;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila; R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila tendo 6 a 10 carbonos ou heteroarila;

R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

R^{17} é independentemente OH, O-n-alquila tendo 1 a 6 carbonos, ou O-acila tendo 2 a 6 carbonos;

R^{18} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, CONHC₆H₅; CH₂OH; CH₂OCH₃; CH₂OC(CH₃)₃; CH₂NH₂; CO₂CH₃; ou CONR²⁴R²⁵;

R^{24} e R^{25} , independentemente, são H; alquila tendo 1 a 6 carbonos; fenila; ou hidroxialquila de 1-6 carbonos; ou, juntos com o

nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -NO₂; -OR¹⁰; - O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; O-tetraidropiranila; -NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸; -NHC(=NH)NH₂; -NR¹⁰SO₂R⁹; -S(O)_yR^π; -CO₂R⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -COR⁹; -CH₂OR⁷; -CH=NNR¹²R¹³; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH=NNHCH(N=NH)NH₂; -SO₂NR¹²R¹³; -PO(OR¹¹)₂ ou -OR¹⁴;

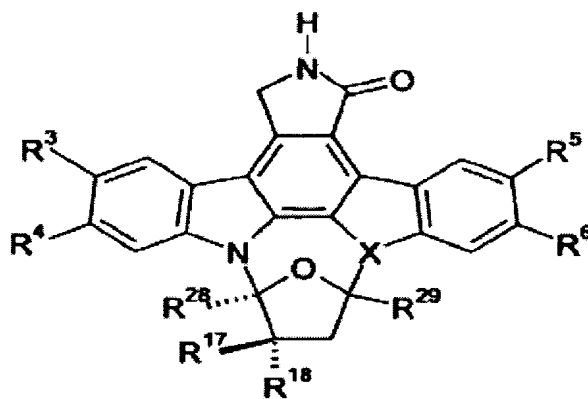
R^{28} é independentemente alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, - (CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

R^{29} é independentemente H, alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, - (CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

p é um inteiro de 1 a 4; e
y é 0, 1 ou 2.

Em certas outras formas de realização, o pirrolocarbazol fundido tem a estrutura de Fórmula III em que: R³, R⁴, R⁵ e R⁶ são cada um independentemente H, fenila, F, Cl, -OR¹⁰, NR⁷R⁸, -(CH₂) NR⁷R⁸, ou alquila tendo 1 a 8 carbonos, em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R²⁷; ou um estereoisômero ou forma de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

Em certas formas de realização preferidas dos compostos de Fórmula III, o indolocarbazol de Fórmula III é substancialmente enantiomericamente puro. Em formas de realização preferidas em que o indolocarbazol de Fórmula III é substancialmente enantiomericamente puro, ele tem a estrutura:



ou um seu estereoisômero ou sal farmaceuticamente aceitável;

em que R^3 , R^4 , R^5 , R^6 , R^{17} , R^{18} , R^{28} , R^{29} , e X são como descritos aqui antes para os compostos de Fórmula II e as formas de realização para Fórmula III aqui descrita. Em algumas formas de realização preferidas, R^3 , R^4 , R^5 , e R^6 de indolocarbazol de Fórmula III são cada um H. Em outras formas de realização:

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H, Cl, alquila de 1-4 carbonos, $-OR^{10}$, CH_2OR^{10} , NR^7R^8 , $CH_2NR^7R^8$, ou $CONR^7R^8$;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

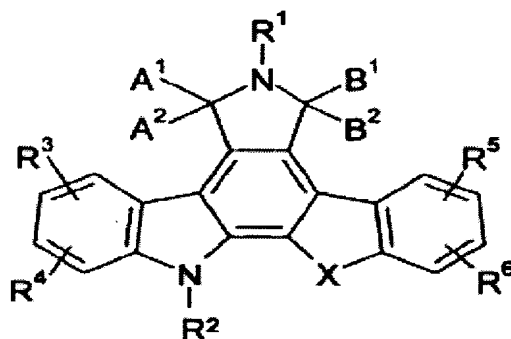
R^{17} é independentemente OH, ou O-n-alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{18} é independentemente H, CH_2OH , CO_2CH_3 , $CO_2CH_2CH_3$, $CO_2CH_2CH_2CH_3$, ou $CO_2CH(CH_3)_2$; ou

R^{28} é independentemente CH_3 ; e

R^{29} é independentemente H ou CH_3 .

Em formas de realização adicionais de compostos de Fórmula I, o pirrolocarbazol fundido tem a estrutura de Fórmula I-A:



Fórmula I-A

ou um estereoisômero ou forma de sal farmaceuticamente aceitável do mesmo,
em que:

R^1 é independentemente H; alquila; fenila; arilalquila tendo 7
to 10 carbonos; heteroarila de 5 a 6 membros; heteroarilalquila; $-\text{COR}^9$; $-\text{OR}^{10}$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; ou $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$;

R^2 é independentemente H; $-\text{SO}_2\text{R}^9$; $-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{COR}^9$; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 a 8 carbonos; alquinila tendo 2 a 8
carbonos; ou um monossacarídeo tendo 5 a 7 carbonos,

em que cada grupo hidroxila do monossacarídeo, independentemente, é opcionalmente substituído por uma alquila tendo 1 a 4 carbonos, alquilcarbonilóxi tendo 2 a 5 carbonos ou alcóxi tendo 1 a 4 carbonos; e

em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

em que, quando X for CHR^{16} , então R^2 e R^{16} podem opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são
opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} , respectivamente; e a posição 3 do furano de ligação é dissustituída por R^{17} e R^{18} ;

R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; fenila; heteroarila de 5 a 6 membros; F; Cl; Br; I; $-\text{CN}$; CF_3 ; $-\text{NO}_2$; $-\text{OR}^{10}$; $(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; -

$O(CH_2)_pNR^7R^8$; $-OCOR^9$; $-OCONHR^9$; $-CH_2OR^{14}$; $-NR^7R^8$; $-NR^{10}COR^9$; $-NR^{10}CO_2R^9$; $-NR^{10}CONR^7R^8$; $-S(O^R^{11})$; $-CO_2R^9$; $-COR^9$; $-CONR^7R^8$; $-CHO$; $-CH=NOR^{11}$; $-CH=NR^9$; $-CH=NNR^{12}R^{13}$; $-(CH_2)_pS(O)_yR^9$; $-CH_2SR^{15}$; $-CH_2S(O)_yR^{14}$; $-(CH_2)_pNR^7R^8$; $-(CH_2)_pNHR^{14}$; alquila tendo 1 a 8 carbonos; alquenila tendo 2 a 8 carbonos; ou alquinila tendo 2 a 8 carbonos; em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

X é CHR^{16} ou alquilenos tendo 1 a 2 carbonos opcionalmente substituído por pelo menos um de OH , $=O$, $=NOR^{11}$, OR^{11} , $-OCOR^9$, $-OCONR^7R^8$, $-O(CH_2)_pNR^7R^8$, $-O(CH_2)_pOR^{10}$, arila, arilalquila, heteroarila, $-SO_2R^9$; $-CO_2R^9$, $-COR^9$, alquila tendo 1 a 8 carbonos, alquenila tendo 2 a 8 carbonos, alquinila tendo 2 a 8 carbonos, ou um monossacarídeo tendo 5 a 7 carbonos, em que cada grupo hidroxila do monossacarídeo, independentemente, é opcionalmente substituído por uma alquila tendo 1 a 4 carbonos, alquilcarbonilóxi tendo 2 a 5 carbonos ou alcóxi tendo 1 a 4 carbonos; e em que os grupos alquila, alquenila ou alquinila são opcionalmente substituídos por um a três grupos R^{27} ;

A^1 e A^2 , independentemente, são H , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, ou $-N(R^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=O$, $=S$, ou $=NR^{11}$;

B^1 e B^2 independentemente, são H , $-OR^{11}$, $-SR^{11}$, ou $-N(R^{11})_2$; ou, combinados entre si, formam um componente, isto é $=O$, $=S$, ou $=NR^{11}$; com a condição de que pelo menos um do par de A^1 e A^2 , ou B^1 e B^2 seja combinado para formar $=O$;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila;

R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

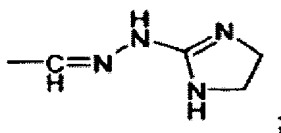
R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

R^{15} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{16} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila; ou quando X for CHR^{16} , então R^2 e R^{16} podem opcionalmente ser combinados entre si para formar uma ligação furano via suas posições 2 e 5 e em que as posições 2 e 5 do furano de ligação são opcionalmente substituídas por R^{28} e R^{29} , respectivamente; e a posição 3 do furano de ligação é dissubstituída por R^{17} e R^{18} ;

R^{17} é independentemente OH, O-n-alquila tendo 1 a 6 carbonos, ou O-acila tendo 2 a 6 carbonos;

R^{18} é independentemente H; alquila tendo 1 a 4 carbonos; $CONHC_6H_5$; CH_2Y , em que Y é OR^{19} , SOR^{20} , $NR^{21}R^{22}$, ou SR^{23} ; N_3 ; CO_2R^{15} ; S-Glc; $CONR^{24}R^{25}$; $CH=NNHCONH_2$; $CONHOR^{10}$; $CH=NOR^{10}$; $CH=NNHC(=NH)NH_2$;



$CH=NN(R^{26})_2$; ou $CH_2NHCONHR^{16}$; ou

R^{17} e R^{18} são opcionalmente combinados entre si para formar - $CH_2NHCO_2^-$, - $CH_2OC(CH_3)_2O^-$, =O, ou - $CH_2N(CH_3)CO_2^-$;

R^{19} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou acila tendo 2 a 5 carbonos;

R^{20} é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou um grupo heterocicloalquila incluindo um átomo de nitrogênio;

R^{21} e R^{22} , independentemente, são H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, Pro, Ser, Gly, Lys, ou acila tendo 2 a 5 carbonos, com a condição de que somente um de R^{21} e R^{22} seja Pro, Ser, Gly, Lys ou acila;

R^{23} é independentemente uma arila, alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou um grupo heterocicloalquila que inclui um átomo de nitrogênio;

R^{24} e R^{25} , independentemente, são H; alquila tendo 1 a 6 carbonos; fenila; ou hidroxialquila de 1-6 carbonos; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^{26} é independentemente arila;

R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; -CN; -NO₂; -OR¹⁰; -O(CH₂)_pNR⁷R⁸; -OCOR⁹; -OCONHR⁹; O-tetraidropirânica; -NR⁷R⁸; -NR¹⁰COR⁹; -NR¹⁰CO₂R⁹; -NR¹⁰CONR⁷R⁸; -NHC(=NH)NH₂; -NR¹⁰SO₂R⁹; -S(O)_yR¹¹; -CO₂R⁹; -CONR⁷R⁸; -CHO; -COR⁹; -CH₂OR⁷; -CH=NNR¹²R¹³; -CH=NOR¹¹; -CH=NR⁹; -CH-NNHCH(N=NH)NH₂; -SO₂NR¹²R¹³; -PO(OR¹¹)_i Ou -OR¹⁴;

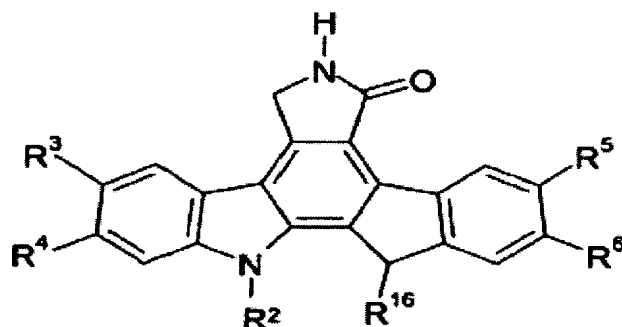
R^{28} é independentemente alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, -(CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

R^{29} é independentemente H, alquila tendo de 1 a 4 carbonos, alcóxi tendo de 1 a 4 carbonos, arilalquila tendo de 7 a 10 carbonos, -(CH₂)_pOR¹⁰, -(CH₂)_pOC(=O)NR⁷R⁸, ou -(CH₂)_pNR⁷R⁸;

p é um inteiro de 1 a 4; e

y é 0, 1 ou 2.

Em certas formas de realização de compostos de Fórmula I-A, o composto tem a estrutura:



em que:

R^2 é independentemente $-\text{CO}_2\text{R}$; $-\text{COR}^9$; alquila tendo 1 a 4 carbonos; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R^{27} ;

5 R^3 , R^4 , R^5 e R^6 , independentemente, são H; fenila; Cl; $-\text{OR}^{10}$; $(\text{CH}_2)_p\text{OR}^{10}$; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; ou alquila tendo 1 a 6 carbonos; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R^{27} ;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila, ou heteroarila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

15 R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila;

R^{12} e R^{13} , independentemente, são H, alquila, arila tendo 6 a 10 carbonos, ou heteroarila; ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 7 membros;

20 R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

R^{16} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{27} é independentemente arila; heteroarila; F; Cl; Br; I; $-\text{CN}$; $-\text{NO}_2$; $-\text{OR}^{10}$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{OCOR}^9$; $-\text{OCONHR}^9$; O-tetrahidropiranila; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^{10}\text{COR}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{NHC}(=\text{NH})\text{NH}_2$; -

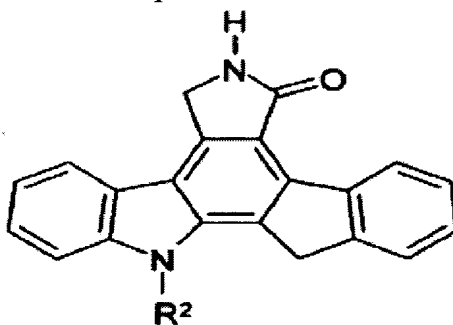
$\text{NR}^{10}\text{SO}_2\text{R}^9$; $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{11}$; $-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{CHO}$; $-\text{COR}^9$; $-\text{CH}_2\text{OR}^7$; $-\text{CH}=\text{NNR}^{12}\text{R}^{13}$; $-\text{CH}=\text{NOR}^{11}$; $-\text{CH}=\text{NR}^9$; $-\text{CH}=\text{NNHCH}(\text{N}=\text{NH})\text{NH}_2$; $-\text{SO}_2\text{NR}^{12}\text{R}^{13}$; $-\text{PO}(\text{OR}^{11})_2$; ou $-\text{OR}^{14}$;

p é um inteiro de 1 a 4; e

5

y é O, 1 ou 2.

Em outras formas de realização das formas de realização dos compostos de Fórmula I-A, o composto tem a estrutura:



em que:

R^2 é independentemente $-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{COR}^9$; alquila tendo 1 a 4 carbonos; em que o grupo alquila é opcionalmente substituído por um a três grupos R^{27} ;

R^7 e R^8 , independentemente, são H ou alquila de 1 a 4 carbonos, ou, juntos com o nitrogênio a que são ligados, formam uma heterocicloalquila de 5 a 6 membros, opcionalmente contendo um átomo de nitrogênio no anel adicional;

R^9 é independentemente alquila tendo 1 a 4 carbonos, ou fenila;

R^{10} é independentemente H ou alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{11} é independentemente H, alquila tendo 1 a 4 carbonos;

R^{14} é independentemente o resíduo de um aminoácido, após o grupo hidroxila do grupo carboxila ser removido;

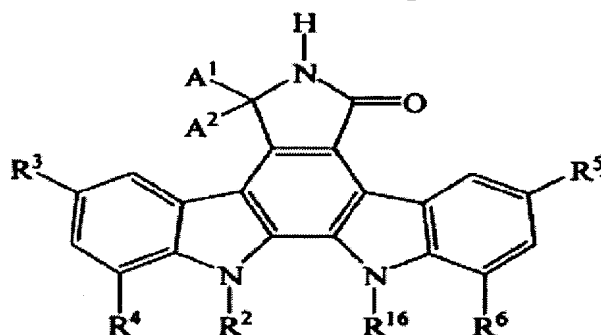
R^{27} é independentemente fenila; heteroarila de 5-6 membros no anel; $-\text{OR}^{10}$; $-\text{O}(\text{CH}_2)_p\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{OCOR}^9$; $-\text{OCONHR}^9$; O-tetraidropiranila; $-\text{NR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^{10}\text{COR}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{NR}^{10}\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{NR}^{10}\text{SO}_2\text{R}^9$; $-\text{S}(\text{O})_y\text{R}^{11}$;

$-\text{CO}_2\text{R}^9$; $-\text{CONR}^7\text{R}^8$; $-\text{COR}^9$; $-\text{CH}_2\text{OR}^7$; ou $-\text{OR}^{14}$;

p é um inteiro de 1 a 4; e

y é 0, 1 ou 2.

Os pirrolocarbazóis fundidos dentro do escopo da invenção
5 podem também ser representados pela Fórmula IV. Os derivados de Fórmula IV são a seguir referidos como compostos IV-I a IV-4, inclusive. Os derivados funcionais que são representados pela Fórmula IV são:



Fórmula IV

ou um estereoisômero ou forma de sal farmacologicamente aceitável do mesmo, em que:

10 (a) R^2 e R^{16} são cada um independentemente selecionados do grupo consistindo de H, alquila de 1 a 6 carbonos, hidroxialquila de 1 a 3 carbonos, e alquenila de 3 a 6 carbonos, com a condição de que tanto R^2 como R^{16} não sejam H;

15 (b) A^1 e A^2 são ambos hidrogênio e R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são cada um independentemente H ou até dois deles são F, Cl, Br, I, NO_2 , CN, ou OH; NHCONHR^7 em que R^7 é C_6H_5 ou alquila de 1 a 3 carbonos com a condição de que somente um de R^1 , R^2 , R^5 e R^6 seja NHCONHR^7 ; CH_2OR^7 ; alquila de 1 a 3 carbonos; $\text{CH}_2\text{OCONHC}_2\text{H}_5$; ou NHCO_2CH_3 ; e

20 (c) quando A^1 e A^2 forem ambos combinados entre si para representar O; e R^3 , R^4 , R^5 e R^6 são cada um hidrogênio.

Compostos preferidos de Fórmula IV, para uso em qualquer dos vários métodos da invenção, são aqueles compostos IV-1 a IV-4 da Tabela 1, em que as seguintes substituições são feitas.

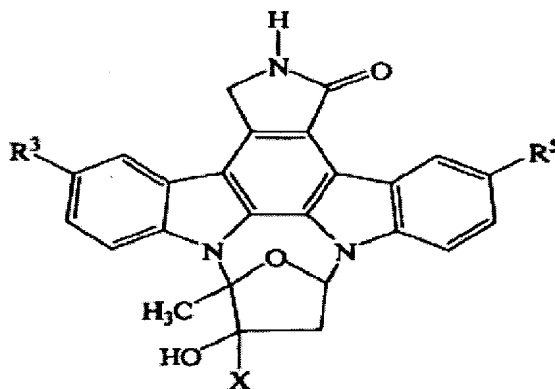
Tabela 1

Composto ⁽¹⁾	R ²	R ¹⁶
IV-1	CH ₂ CH=CH ₂	CH ₂ CH=CH ₂
IV-2 ⁽²⁾	CH ₂ CH=CH ₂	H
IV-3 ⁽²⁾	H	CH ₂ CH=CH ₂
IV-4	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH	CH ₂ CH ₂ CH ₂ OH

(1) R³, R⁴, R⁵, R⁶, são hidrogênio. A¹ e A² são ambos hidrogênio.

(2) Uma mistura de 1,5 a 1,0 de componentes IV-2 e IV-3.

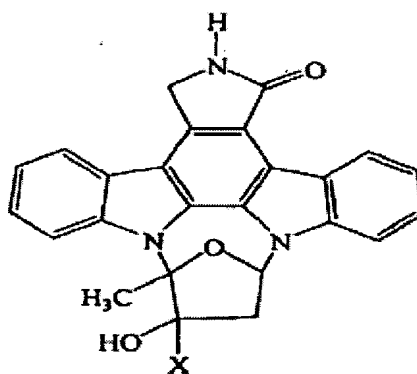
5 A invenção também caracteriza compostos representados pela seguinte Fórmula V:



Fórmula V

em que R⁵ representa halogênio, CH₂OCONHR¹⁴, OrNHCO₂R¹⁴ (em que R¹⁴ representa alquila inferior); R³ representa hidrogênio ou halogênio; e X representa CO₂CH₃, CH₂OH, ou CONHR¹⁵ (em que R¹⁵ representa hidrogênio, alquila inferior substituída por hidróxi, ou arila), desde que a
 10 combinação de R⁵ = halogênio, R³ = hidrogênio, e X = CO₂CH₃ ou CH₂OH, e a combinação de R⁵ = R³ = halogênio e X = CO₂CH₃, e a combinação de R⁵ = R³ = Br e X = CONHC₈H₅, são excluídas. As formas estereoisoméricas e sais farmacêuticamente aceitáveis dos compostos de Fórmula V são adequados para uso nos métodos da invenção.

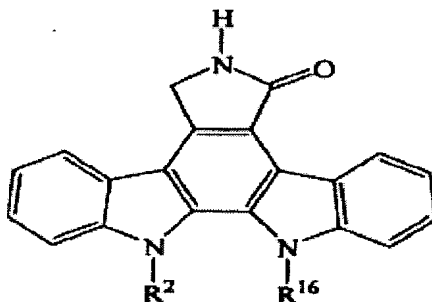
15 Em certas formas de realização, o pirrolocarbazol fundido tem a estrutura de Fórmula



Fórmula VI

em que X representa $\text{CH}_2\text{S}(\text{O})\text{R}^{16}$ (em que R^{16} representa arila ou a grupo heterocíclico incluindo um átomo de nitrogênio), $\text{CH}_2\text{SR}^{16}$, $\text{CH}=\text{NN}(\text{R}^{17})_2$ (em que R^{17} representa arila), $\text{CH}_2\text{NHCONHR}^{18}$ (em que R^{18} representa alquila inferior ou arila), ou $\text{CH}_2\text{CO}_2\text{CH}_3$. Formas estereoisoméricas e sais farmacologicamente aceitáveis de compostos de Fórmula VI são adequados para uso nos métodos da invenção.

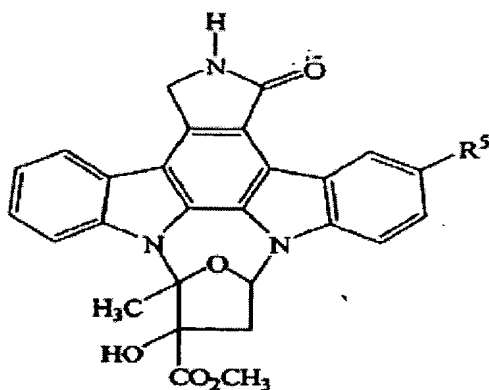
A invenção também caracteriza compostos representados pela seguinte Fórmula VII:



Fórmula VII

em que um de R^2 e R^{16} é hidrogênio e o outro é alila, ou ambos são alila, ou um seu sal farmacologicamente aceitável.

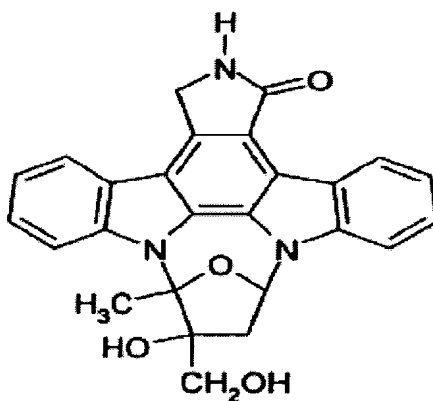
O pirrolocarbazol fundido pode também ser um composto tendo a estrutura de Fórmula VIII:



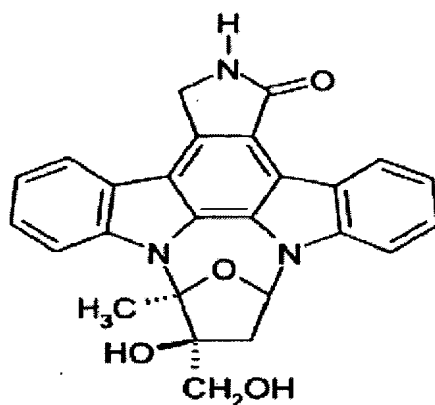
Fórmula VIII

em que R^5 representa $CH(SC_6H_5)_2$, $CH(-SCH_2CH_2S-)$, CH_2SR^{24} (em que R^{24} representa benzimidazol-2-ila, furfurila, 2-dimetilaminoetila, ou 1H-1,2,4-triazol-3-il), ou $CH=NR^{25}$ (em que R^{25} representa pirrolidin-1-ila, piridin-2-ilamino, guanidino, morfolino, dimetilamino, ou 4-metilpiperazin-1-ila), ou
 5 um seu sal farmaceuticamente aceitável.

Em outras formas de realização preferidas, o pirrolocarbazol fundido é:



Ainda mais preferivelmente o pirrolocarbazol fundido acima é substancialmente enanciomericamente puro. Em uma outra forma de
 10 realização, o pirrolocarbazol fundido é:



CEP-701

Como aqui usado, o composto tendo esta estrutura é referido como "CEP-701".

Os pirrolocarbazóis fundidos para uso no método da invenção podem ser formulados, individualmente ou em combinação, em composições farmacêuticas por mistura com excipientes e veículos não-tóxicos farmaceuticamente aceitáveis. Tais composições podem ser preparadas para uso na administração parenteral, particularmente na forma de soluções ou suspensões líquidas; para administração oral, particularmente na forma de líquido, tabletes ou cápsulas; ou intranasalmente, particularmente na forma de pós, gotas nasais ou aerossóis.

A composição pode ser administrada convenientemente em forma de dosagem unitária e pode ser preparada por qualquer um dos métodos conhecidos na técnica. Tais métodos são descritos, por exemplo, em Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., Easton, Pa., 1980).

As formas de dosagem líquida para administração oral incluem emulsões, microemulsões, soluções, suspensões, xaropes e elixires farmaceuticamente aceitáveis. Além do composto ativo, as formas de dosagem líquidas podem conter diluentes inertes comumente usados na técnica, tais como, por exemplo, água ou outros solventes, agentes solubilizantes e emulsificadores, tais como etil álcool, isopropil álcool, etil carbonato, etil acetato, benzil álcool, benzil benzoato, propileno glicol, 1,3-

butileno glicol, dimetilformamida, óleos (em particular, óleos de algodão, *ground nut* (plantas de tubérculos comestíveis), milho, germe, oliva, rícino e sésamo), glicerol, tetraidrofurfuril álcool, polietileno glicóis e ésteres de ácido graxo de sorbitano, e suas misturas. Além de diluentes inertes, as
5 composições orais podem também incluir adjuvantes tais como agentes umectantes, agentes emulsificantes e de suspensão, adoçantes, aromatizantes e perfumantes.

As formas de dosagem sólida para administração oral incluem cápsulas, tabletes, pílulas, pós e grânulos. Em tais formas de dosagem sólida,
10 o composto ativo é misturado com pelo menos um excipiente ou veículo inerte farmacologicamente aceitável, tal como citrato de sódio ou fosfato dicálcico e/ou (a) cargas ou dilatores, tais como amidos, lactose, sacarose, glicose, manitol e ácido silícico; (b) aglutinantes tais como, por exemplo, carboximetilcelulose, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarose e
15 acácia; (c) umectantes tais como glicerol; (d) agentes desintegrantes tais como ágar-ágar, carbonato de cálcio, amido de batata ou tapioca, ácido algínico, certos silicatos e carbonato de sódio; (e) agentes retardantes de solução tais como parafina; (f) aceleradores de absorção, tais como compostos de amônio quaternário; (g) agentes umectantes tais como, por exemplo, cetil álcool e
20 glicerol monoestearato; (h) absorventes tais como caulim e argila de bentonita; e (i) lubrificantes tais como talco, estearato de cálcio, estearato de magnésio, polietileno glicóis sólidos, lauril sulfato de sódio e suas misturas. No caso de cápsulas, tabletes e pílulas, a forma de dosagem pode também compreender agentes tamponantes. Composições sólidas de um tipo similar
25 podem também ser empregadas como cargas em cápsulas de gelatina carregadas moles e duras, empregando-se tais excipientes como lactose ou açúcar do leite, bem como polietileno glicóis de elevado peso molecular e similares.

Também podem ser empregadas composições sólidas de um

tipo similar como cargas em cápsulas de gelatina carregada moles e duras, empregando-se tais excipientes como lactose ou açúcar do leite, bem como polietileno glicóis de elevado peso molecular e similares.

Os compostos ativos podem também ser em forma
5 microencapsulada com um ou mais excipientes como citado acima. Em formas de dosagem sólidas, o composto ativo pode ser misturado com pelo menos um diluente inerte, tal como sacarose, lactose ou amido. Tais formas de dosagem podem também compreender, como na prática normal, substâncias adicionais que não diluentes inertes, p. ex., lubrificantes de
10 tabletagem e outros auxiliares de tabletagem, tais como estearato de magnésio e celulose microcristalina. No caso de cápsulas, tabletes e pílulas, as formas de dosagem podem também compreender agentes de tamponamento. Elas podem opcionalmente conter agentes opacificantes e podem também ser de uma composição que libere o(s) ingrediente(s) ativo(s) somente ou,
15 preferencialmente, em uma certa parte do trato intestinal, opcionalmente em uma maneira retardada. Exemplos de composições de embutimento que podem ser usadas incluem substâncias poliméricas e ceras.

A dosagem ótima dos compostos da presente invenção pode variar, dependendo de fatores tais como tipo e extensão da progressão do
20 distúrbio mieloproliferativo, da condição de saúde total do paciente, idade e peso do paciente, potência do composto e da via de administração. A otimização da dosagem do composto está dentro da habilidade comum na técnica e os valores dentro das faixas providas aqui incluem qualquer valor que se situe dentro da faixa. O ingrediente ativo das formulações para uso no
25 método da invenção é eficaz quando uma concentração no plasma é de cerca de 1 a cerca de 20 μM , incluindo qualquer valor dentro desta faixa, incluindo mas não limitado a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, e 19 μM . Em algumas formas de realização preferidas, o composto é administrado para alcançar uma concentração no plasma de cerca de 5 a cerca de 15 μM .

Em outras formas de realização preferidas, o composto é administrado para alcançar uma concentração no plasma de cerca de 7,5 a cerca de 15 μM .

Em certas formas de realização da presente invenção, a dosagem do composto é de cerca de 200 $\mu\text{g/kg}$ a cerca de 1 g/kg de peso corporal por dia. Mais preferivelmente, a dosagem do composto é de 250 $\mu\text{g/kg}$ a cerca de 3 mg/kg de peso corporal por dia. Mais preferivelmente, a dosagem do composto é de cerca de 0,5 mg/kg a cerca de 2,3 mg/kg de peso corporal por dia. Mais preferivelmente, a dosagem do composto é de cerca de 0,8 mg/kg a cerca de 1,3 mg/kg de peso corporal por dia.

Em certas formas de realização, a dose diária do adulto médio (aprox. 70 kg) é de cerca de 20 mg a cerca de 300 mg, ou de cerca de 40 mg a cerca de 250 mg, ou de cerca de 40 a cerca de 100 mg. Mais preferivelmente, a dose diária é de cerca de 80 mg a cerca de 160 mg. A dose diária pode tipicamente ser administrada uma vez por dia, duas vezes por dia, três vezes por dia ou quatro vezes por dia. Em algumas formas de realização o regime de dosagem é de cerca de 20 a cerca de 120 mg, duas vezes por dia. Em outras formas de realização, é de cerca de 20 a cerca de 100 mg, duas vezes por dia. Em outras formas de realização, a dose é de cerca de 60 a cerca de 80 mg, duas vezes por dia.

No método da invenção, quando uma quantidade terapêutica do inibidor JAK2 é administrada, a atividade de numerosas outras proteínas, na presença do inibidor JAK2 é menor do que a atividade das outras proteínas na ausência do inibidor JAK2. Estas outras proteínas são, por exemplo, numerosas das seguintes proteínas: JAK2, STAT5, STAT3, SHP2, GAB2, AKT e ERK.

A presente invenção é ainda ilustrada pelos seguintes exemplos. Os exemplos são providos somente para fins de ilustração e não devem ser interpretados como limitando o escopo ou conteúdo da invenção de forma alguma.

EXEMPLOS

Células e linhagens de células do Paciente

HEL 92.1.7. A linhagem de célula da eritro leucemia humana HEL 92.1.7 foi comprada de ATCC (TIB-180) e as células foram cultivadas em meio RPMI 1640 com 2 mM L-glutamina ajustada para conter 1,5 g/l de bicarbonato de sódio, 4,5 g/l de glicose, 10 mM HEPES e 1,0 mM piruvato de sódio e soro de bovino fetal, 10%, como recomendado. CEP-701 ou veículo foi adicionado a um meio completo incubado como indicado.

CD34+. Sangue periférico foi coletado de pacientes diagnosticados com MPDs na University of Pennsylvania Cancer Center, após consentimento informado. As células sanguíneas foram separadas por centrifugação de gradiente Ficoll (Pharmacia). A camada celular mononuclear foi removida e lavada. As células mononucleares foram incubadas com contas imunomagnéticas anti-CD34 e células CD34+ foram purificadas utilizando-se o classificador de células magnético AutoMacs (Miltenyi Biotech, todos os protocolos com contas e dispositivo conforme recomendações do fabricante). Células CD34+ foram lavadas e contadas. As células foram usadas frescas ou congeladas como células viáveis em 10% DMSO. As células CD34+ foram cultivadas em meio IMDM contendo 20% de substituto de soro (BIT 9500, Stem Cell Technologies, Vancouver). As células foram incubadas com fator de célula tronco, interleucina 6 e interleucina 3 por 3 – 5 dias para expansão inicial. Após incubação inicial, eritropoietina foi adicionada ao meio de cultura. As células foram ainda expandidas por 2 – 5 dias até células adequadas estarem disponíveis para os experimentos. Todas as citocinas foram obtidas de R&D Systems.

Os pacientes com Mielofibrose Idiopática Crônica (CIMF) foram genotipados usando-se os métodos PCR e de Digestão de Restrição descritos acima. Os pacientes #648 e #650 foram constatados conter a mutação V617F, como mostrado por PCR específica de alelo (Fig. 12) e

digestão BsaXI (Fig. 13). Na Fig. 14, o produto PCR SCL foi usado como um controle. Na digestão com BsaXI, o produto SCL de 496 pb é cortado em fragmentos de 356 pb, 110 pb e 30 pb.

Exemplo 1

5 Inibição da Atividade de JAK2 Quinase por CEP-701

CEP-701 foi testada quanto a sua capacidade de inibir a atividade de quinase de JAK2 expresso por baculovírus em um ensaio de placa de microtítulo utilizando detecção de fluorescência resolvida pelo tempo (TRF). As placas de elevada ligação Costar de 96 poços (Corning Costar #3922. Corning, NY) foram primeiro revestidas com 100 µL/poço de 10 µg/mL de Neutravidina (Pierce #31000, Rockford, IL) em solução salina Tris-tamponada (TBS) a 37°C por 2 horas, seguido por 100 µl/poço de 1 µg/ml substrato de peptídeo 15-mer (biotinil-amino-hexanoil-EQEDEPEGDYFEWLE-amida, Infinity Biotech Research e Resource, Aston, PA) a 37°C por outra hora. A mistura de ensaio JAK2 (volume total = 100 µL/poço) consistindo de 20 mM HEPES (pH 7,2), 0,2 µM ATP, 1 mM MnCl₂, 0,1% albumina de soro bovino (BSA), e concentrações variáveis de CEP-701 (diluído em DMSO; 2,5% DMSO final no ensaio) foram então adicionadas à placa de ensaio. Enzima (15 ng/ml JAK2 Lote # JAK2[318], JA2-2,1) foi adicionada e a reação foi permitida prosseguir em temperatura ambiente por 20 minutos. Detecção do produto fosforilado foi realizada adicionando-se 100 µl/poço de anticorpo PY100 rotulado Eu-N1 (PerkinElmer Life Sciences #AD0041, Boston, MA) diluído 1:5000 em TBS contendo 0,05% Tween-20 e 0.25% BSA. Incubação em temperatura ambiente então prosseguiu por 1 hora, seguido por adição de 100 µl de solução intensificada (PerkinElmer Life Sciences #1244-105. Boston, MA). A placa foi suavemente agitada e, após trinta minutos, a fluorescência da solução resultante foi medida usando-se a leitora de placa de multi-rótulos PerkinElmer EnVision 2100 (ou 2102). Curvas de inibição foram geradas em

replicas e plotadas como inibição percentual versus log₁₀ da concentração do composto. Os dados foram analisados por regressão não-linear pela adaptação à equação de dose-resposta sigmoidal (inclinação variável) em GraphPad Prism como segue:

$$y = \text{base} + (\text{topo} - \text{base}) / (1 + 10 (\log \text{IC}_{50-x}) * \text{Hillslope})$$

- 5 em que y é a inibição % em uma dada concentração do composto, x é o logaritmo da concentração do composto, base é a inibição percentual na mais baixa concentração do composto testado e topo é a inibição % na mais elevada concentração do composto testada e topo é a inibição % na mais elevada concentração de composto examinada. Os valores para base e topo
- 10 foram fixados em 0 e 100, respectivamente. Os valores IC₅₀ das curvas individuais tiveram sua média calculada e informada como o valor IC₅₀ médio. A concentração de CEP-701 versus atividade JAK2 foi plotada (Fig. 1). CEP-701 foi mostrado ter uma IC₅₀ de 0,9 ± 0,2 nM.

Exemplo 2

15 A. PCR específica de alelo para mutação Val617Phe

A genotipagem das linhagens de célula e amostras de pacientes foi realizada como descrito em Baxter, E.J. et al. (2005) "Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders" *Lancet* 365:1054-1061.

- 20 Uma dupla abordagem, incluindo PCR específica de alelo e análise de enzima de restrição, foi usada para determinar o status da mutação V617F. O DNA dos pacientes foi preparado de células granulócitas ou mononucleares, empregando-se Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega) seguindo-se as instruções do fabricante, a menos que de outro
- 25 modo citado. As reações PCR foram realizadas usando-se PCR Core Kit da Promega, de acordo com instruções do fabricante, a menos que de outro modo citado.

Resumidamente, 80 – 200 ng de DNA foram amplificados em

uma reação PCR (temp. de recozimento 58 °C, 38 – 44 ciclos) usando-se o iniciador inverso comum (5'-ctgaatagtcctacagtgttttcagtttca-3') (SEQ ID NO:1) e dois iniciadores para diante. O primeiro foi um iniciador específico de mutante (5'- agcatttggttttaaattatggagtatatt-3') (SEQ ID NO:2) que contém uma
 5 desigualdade intencional na terceiro nucleotídeo a partir da extremidade 3', para melhorar a especificidade e que gera um produto de 203 pb, indicando uma presença da mutação V617F. O segundo iniciador para diante (5'- atctatagtcatgctgaaagtaggagaaag-3') (SEQ ID NO:3) amplifica um fragmento de 364 pb dos alelos mutados e tipo selvagem e serve como um controle
 10 interno. Os resultados são mostrados na Fig. 2 (Painel A). Ambas as amostras HEL 92 mostram amplificação do controle interno bem como o produto de 203 pb do alelo mutante. K562 serviu como um controle tipo selvagem.

B. Ensaio Baseado em Enzima de Restrição do Genótipo JAK2

A mutação G --> T, que resulta na substituição V617F, elimina
 15 um sítio de restrição para a enzima de restrição BsaXI presente em JAK2 tipo selvagem. Assim, a resistência a BsaXI identifica a mutação V617F.

Para avaliar a presença da mutação nas linhagens de célula e amostras de Paciente, 200 ng de DNA genômico abrangendo a posição 617 de JAK2 foram amplificados por PCR (57 °C, 40-44 ciclos), usando-se o
 20 iniciador para diante (5'-gggtttcctcagaacgttga-3') (SEQ ID NO:4) e o iniciador inverso (5'-tcattgctttccttttcacaa-3') (SEQ ID NO:5). O resultante fragmento de 460 pb foi digerido com BsaXI por 3 – 4 horas e analisado em um gel de 2% de agarose. O alelo tipo selvagem gerou fragmentos de 241 pb, 189 pb e 31 pb, enquanto que o alelo mutante permanece intacto. Os fragmentos de DNA
 25 amplificados de células HEL 92 eram resistentes a digestão com BsaXI, enquanto que os fragmentos de células K562 foram completamente digeridos por BsaXI. Para controlar a conclusão da digestão, um fragmento de DNA de um gene SLC humano contendo o sítio BsaXI foi amplificado e digerido com BsaXI. Os iniciadores (5'-tcctggggtcttctgtcttg-3') para diante (SEQ ID NO:6)

e (5'-cctgagaggcaatgggagta-3') inverso (SEQ ID NO:7) amplificaram um produto SLC de 496 pb, que foi digerido dentro de fragmentos de 356 pb, 110 pb e 30 pb. Os resultados são mostrados na Fig. 2 (Painel B).

Exemplo 3

5 Efeitos de CEP-701 na proliferação celular

Células CD34+ purificadas e expandidas foram contadas e revestidas em placas de 96 poços para ensaio XTT. As células foram tratadas com um inibidor JAK2 ou veículo por 24 – 72 horas e a viabilidade celular relativa foi ensaiada usando-se o reagente XTTT (Molecular Probes) de acordo com as recomendações do fabricante.

As células HEL 92.1.7 (2×10^4 /poço) revestidas em placas com 96 poços foram tratadas com CEP-701 ou veículo por 24-72 horas e a viabilidade celular foi ensaiada por reagente MTS (Promega), como recomendado.

15 A viabilidade celular foi avaliada para as células HEL 92.1.7 com CEP-701 (Fig. 4, Painéis A-D). No Painel A, as células foram validadas a 24 horas pós-incubação, na presença de soro bovino fetal (FBS) e no tratamento com CEP-701, em comparação com a viabilidade sem tratamento com medicamento). CEP-701 reduziu a viabilidade das células até cerca de 50% (com $3,0 \mu\text{M}$ CEP-701). No Painel B, as células foram avaliadas a 48 horas pós-incubação, na presença de soro bovino fetal (FBS) e no tratamento com CEP-701, em comparação com a viabilidade sem tratamento com medicamento. CEP-701 reduziu a viabilidade das células até cerca de 25% (com $3,0 \mu\text{M}$ CEP-701). No Painel C, as células foram avaliadas a 24 horas pós-incubação com CEP-701, sem FBS. CEP-701 reduziu a viabilidade das células até cerca de 50% (com $3,0 \mu\text{M}$ CEP-701) em um padrão similar àquele do Painel A. No Painel D, as células foram avaliadas a 48 horas pós-incubação com CEP-701 sem FBS. CEP-701 reduziu a viabilidade das células até cerca de 25% (com $3,0 \mu\text{M}$ CEP-701) em um padrão similar àquele

mostrado no Painel B.

A **Fig. 5** mostra os efeitos de CEP-701 sobre a viabilidade de células HEL cultivadas na presença de soro de bezerro fetal (FCS) com o medicamento reabastecido cada 24 h. Neste experimento, as células HEL 92.1.7 foram expostas a medicamento por 72 horas e avaliadas quanto a viabilidade no ensaio MTS. CEP-701 reduziu a viabilidade das células até menos do que 5% (com 1,0 μ M CEP-701).

Os ensaios MTS indicam que CEP-701 inibe o crescimento das células HEL 92 que contêm a mutação V617F.

A **Fig. 6** mostra os efeitos de CEP-701 na indução da apoptose em células HEL 92, conforme medido por ensaio de liberação de histona/DNA. O ensaio mostra que CEP-701 induziu apoptose.

Exemplo 4

Análise dos efeitos de CEP-701 sobre os trajetos de sinalização

Os efeitos de CEP-701 nos trajetos de sinalização foram avaliados por imunoprecipitação e/ou Western blot, empregando-se anticorpos específicos e extratos de células integrais preparados de linhagens de célula e amostras de paciente cultivadas. Os extratos de células integrais foram preparados em um tampão de lise: (20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton, 2.5 mM pirofosfato de sódio, 1 mM beta-glicerofosfato, 1 mM Na₃VO₄, 1 μ g/ml leupeptina) suplementado com inibidores de protease (Complete Mini, Roche Diagnostic). A concentração da proteína foi determinada e iguais quantidades (10 – 30 μ g/alameda) foram separadas em um gel SDS-PAGE. As proteínas foram transferidas para um filtro de nitrocelulose e os níveis de expressão e/ou fosforilação foram avaliados usando-se anticorpos específicos, como recomendado pelos fabricantes. Blots foram desenvolvidas usando-se Supersignal West Pico System (Pierce) de acordo com instruções do fabricante. A ativação de JAK2 foi determinada por um protocolo de

imunoprecipitação/Western blot.

Resumidamente, JAK2 foi imunoprecipitado de 250 µg de extrato com anticorpo JAK2 empregando-se Immunoprecipitation Starter Pack (Amersham Biosciences) como recomendado. Em seguida à Western blotting, a fosforilação de tirosina de JAK2 foi avaliada sondando-se com anticorpo específico de fosfo-tirosina 4G10 (Upstate).

A **Fig. 3** Pannel A mostra uma inibição dependente de dose da fosforilação de STAT5 por concentrações crescentes de CEP-701 (de 0,1 a 3,0 µM CEP-701). O Pannel B mostra a inibição da fosforilação de JAK2 e STAT3 com crescentes concentrações de CEP-701 (de 0,03 a 1,0 µM). O Pannel B também mostra uma inibição dependente da dose da expressão de BclX_L (um efector a jusante da sinalização JAK2/STAT5).

A **Figura 7** mostra a inibição da fosforilação de STAT5 após 1,0, 1,5 e 2,5 horas de exposição a concentrações crescentes de CEP-701. A inibição média de 5 experimentos é mostrada na base. A IC₅₀ para inibição STAT5 em células HEL 92.1.7 é de cerca de 10 nM, que deve transladar para supressão clinicamente significativa de sinalização JAK2/STAT.

A **Figura 8** mostra inibição da fosforilação de STAT3 após 1,0, 1,5 e 2,5 horas de exposição a concentrações crescentes de CEP-701. A inibição média de 5 experimentos é mostrada na base. A IC₅₀ para inibição STAT3 em células HEL 92.1.7 é de cerca de 10 nM, que deve transladar para supressão clinicamente significativa de sinalização JAK2/STAT.

A **FIGURA 9** mostra os efeitos de α1-AGP sobre a inibição mediada por CEP-701 da atividade STAT5 em células HEL 92. Como mostrado na Fig. 9, 1,0 mg/ml de α1-AGP mudou o IC₅₀ para inibição STAT5 para 3 µM. Estas concentrações são prontamente obteníveis in vivo em um regime de dose de 80 mg, por exemplo.

Exemplo 5

Efeitos de CEP-701 sobre o crescimento de Xenoenxertos de Tumor HEL

92

O efeito de CEP-701 sobre o crescimento de tumor foi avaliado (quando comparado com o controle veículo) em camundongos contendo xenoenxertos HEL 92. Resumidamente, 30 mg/kg CEP-701 foram administrados subcutaneamente duas vezes por dia e os volumes dos tumores foram avaliados em dias selecionados, como mostrado na Fig. 10. O crescimento dos tumores foi inibido por CEP-701 e os volumes dos tumores em camundongos tratados com CEP-701 foram significativamente reduzidos.

Os efeitos de CEP-701 sobre a sinalização JAK2/STAT em xenoenxertos HEL 92 foram também avaliados. Neste estudo, os animais contendo tumores HEL 92 receberam uma única dose de CEP-701 (30 mg/kg, s.c.) e a cinética da inibição STAT5 e STAT3 foi avaliada em diferentes pontos do tempo por Western blot. Como demonstrado na Fig. 11, CEP-701 suprimiu fortemente a fosforilação STAT5 e STAT3 com inibição máxima observada a 2 – 4 h após a administração de medicamento. A cinética da inibição correlacionou-se muito bem com a concentração de CEP-701 em tumores, confirmando ainda a capacidade de CEP-701 suprimir a sinalização JAK2/STAT in vivo.

Exemplo 6

Amostras de Paciente

CEP-701 foi mostrado inibir o crescimento de células CD34+, isoladas do Paciente #648 em um ensaio XTT (Fig. 14). Concentrações crescentes de CEP-701 (0,03 μ M, 0,1 μ M e 0,3 μ M) reduziram o crescimento das células a 24 (Painel A) e 48 horas (Painel B).

A **Fig. 15** mostra uma análise de classificador de células ativado por fluorescência (FACS) de culturas primárias de CD34+, derivadas do Paciente #648 tratado com CEP-701. No Painel A, as barras brancas indicam o número de células vivas. As barras pretas do Painel A indicam indução de apoptose, conforme medido pela Anexina V. No Painel B da Fig.

15, as barras pretas indicam o número de células CD34+ vivas, que foram tratadas por 24 h com concentrações crescentes de CEP-701 e que foram diluídas dentro de um meio fresco e cultivadas por mais 72 h. A contagem das células foi determinada usando-se azul de tripano.

5 A **Figura 16** mostra os efeitos de CEP-701 na sinalização JAK2/STAT em culturas primárias CD34+ derivadas do Paciente #648. Os progenitores hematopoiéticos CD34+ foram purificados do Paciente #648 e cultivados com concentrações crescentes (30 nM, 100 nM, 300 nM e 1000 nm) de CEP-701, como indicado, por 1 h. A expressão e fosforilação de
10 STAT5, STAT3 foi analisada por Western Blot usando-se anticorpos específicos. Para avaliar a atividade JAK2, JAK2 foi imunoprecipitado, seguido por uma Western blot usando-se anticorpo específico de antifosfotirosina (4G10). CEP-701 foi mostrado inibir a sinalização de JAK2/STAT em células precursoras CD34+ cultivadas, contendo a mutação
15 V617F e derivadas de um paciente com MPD.

Os efeitos de CEP-701 sobre a ativação de SHP2, GAB2, AKT e ERK foram avaliados em células CD34+ cultivadas do Paciente #648. Western blot foi usada para examinar a fosforilação e expressão de SHP2, GAB2 (Fig. 7, Painel A) e AKT e ERK (Fig. 17, Painel B). Concentrações
20 crescentes de CEP-701 foram adicionadas às culturas primárias de células CD34+ derivadas do Paciente #648. As concentrações usadas foram 0 (isto é, veículo apenas), 30, 100, 300 e 1000 nM de CEP-701. CEP-701 foi mostrado inibir os trajetos de múltiplas sinalizações envolvidos na proliferação e sobrevivência das células precursoras CD34+, sugerindo uma paralisação
25 geral no nível do receptor em células contendo a mutação V617F. No Painel B, a expressão do gene de manutenção, β -actina, foi usada como um controle.

As células do Paciente #648 foram também avaliadas em experimento examinando a expressão e fosforilação de STAT5 e expressão de BCL-X_L, um alvo a jusante da sinalização JAK2/STAT (Fig. 18).

Concentrações crescentes de CEP-701 foram adicionadas às culturas primárias de células CD34+ derivadas do Paciente #648. As concentrações usadas foram 0 (isto é, veículo apenas), 30, 100, 300 e 1000 nM de CEP-701. A expressão dos genes de manutenção, β -actina e ciclofilina, foi usada como um controle. CEP-701 foi mostrado inibir a sinalização JAK2/STAT e a expressão Bclx1 nestas células. A exposição estendida para CEP-701 (p. ex., múltipla dosagem) pode resultar em uma regulação descendente da expressão STAT5.

Como aqueles hábeis na técnica observarão, numerosas modificações e variações da presente invenção são possíveis à luz dos ensinamentos acima. É portanto entendido que, dentro do escopo das reivindicações anexas, a invenção pode ser praticada de outro modo do que como especificamente descrito aqui, e o escopo da invenção é destinado a abranger todas tais variações.

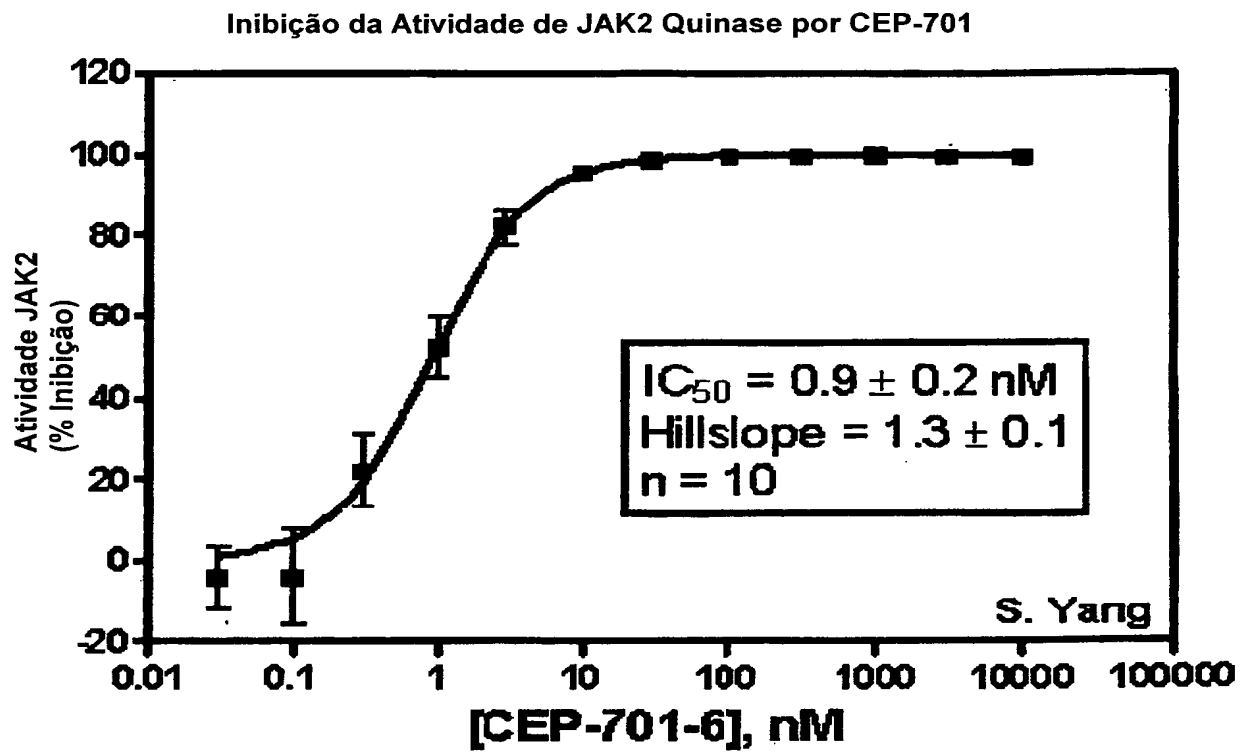
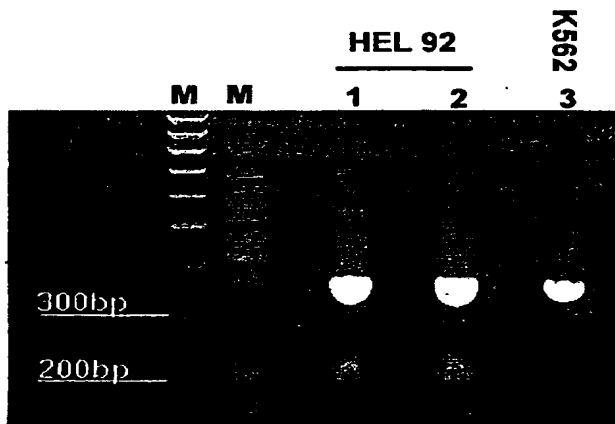
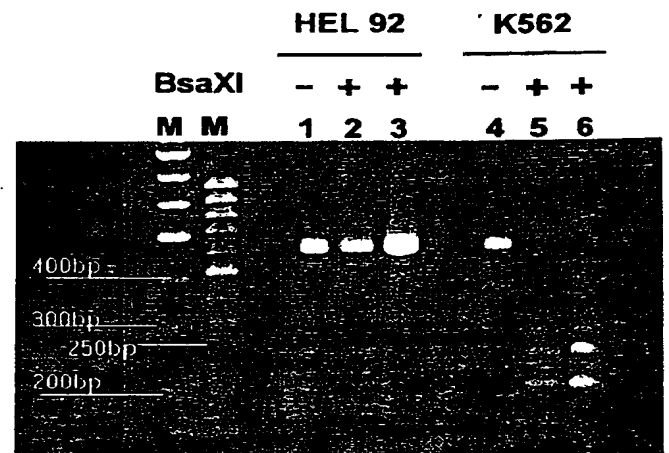
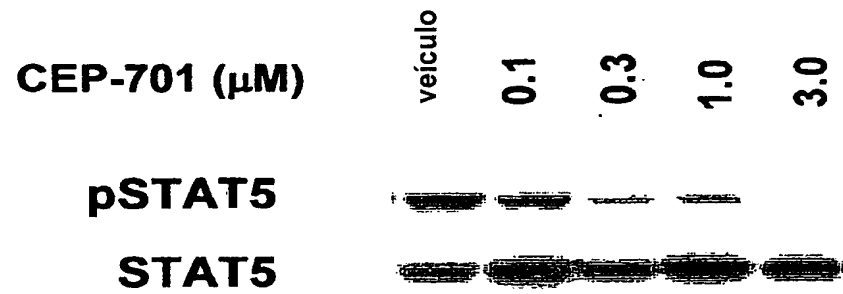
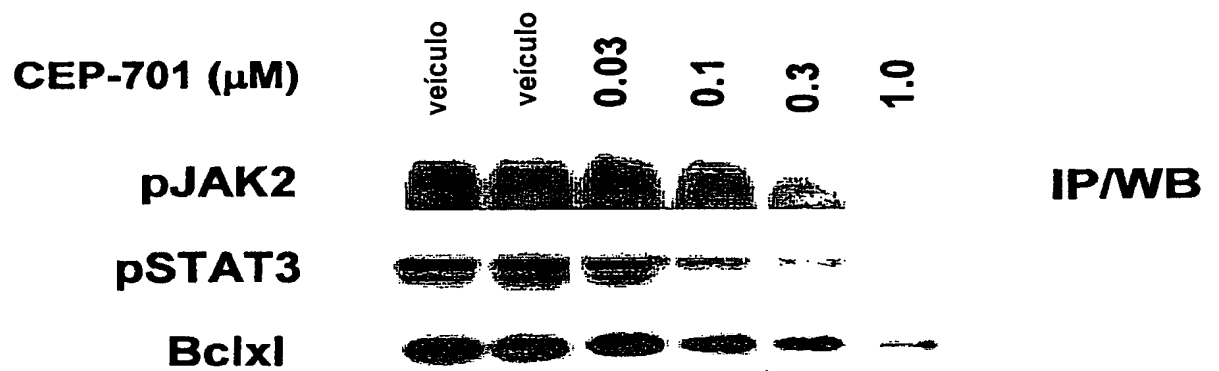


FIGURA 1

A**PCR Específico para Alelo**

364pb = alelos mutante e tipo selvagem
203pb = alelo mutante

B**Análise de restrição****FIGURA 2**

A**B****FIGURA 3**

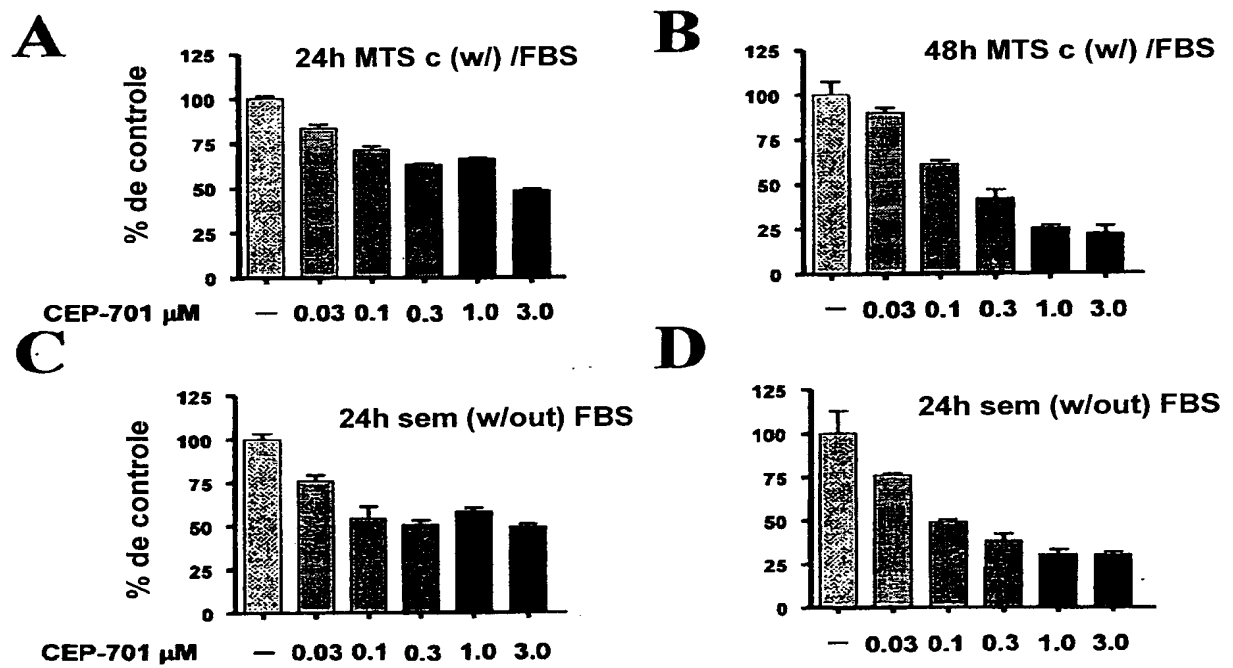


FIGURA 4

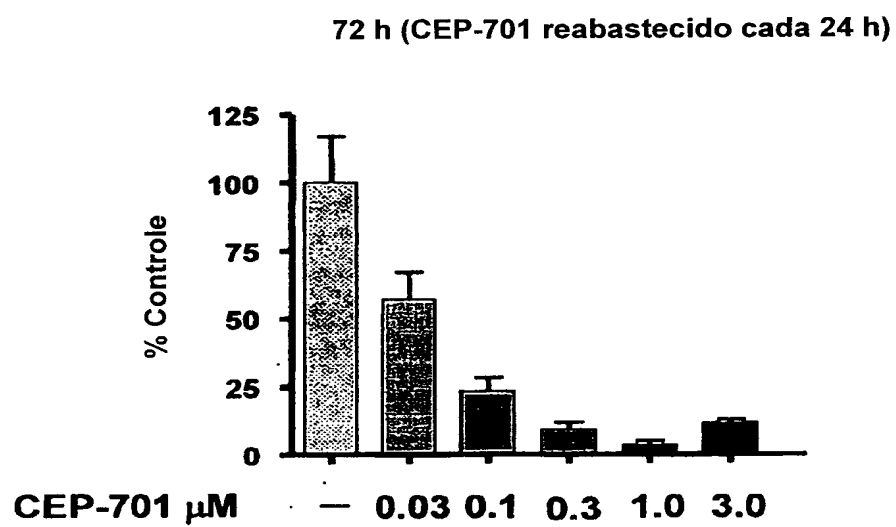


FIGURA 5

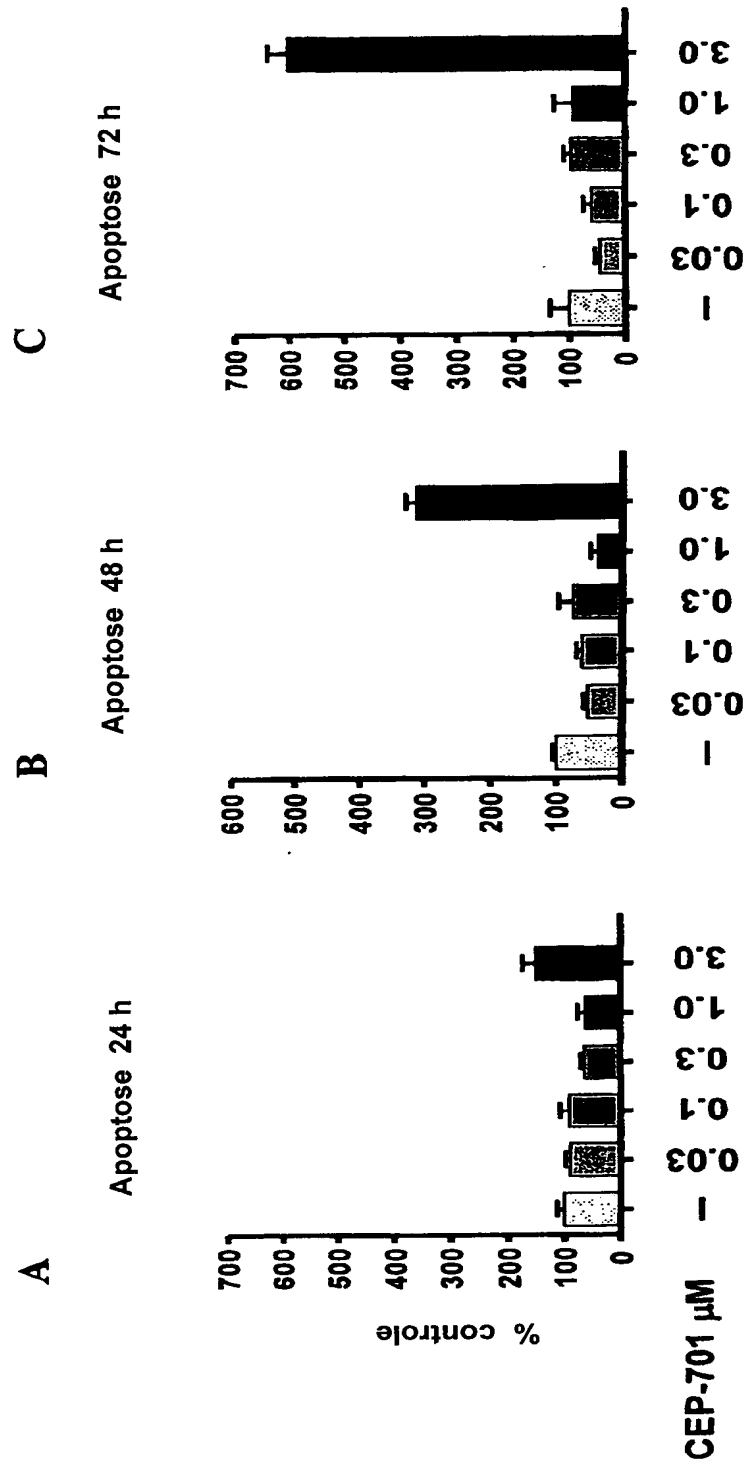


FIGURA 6

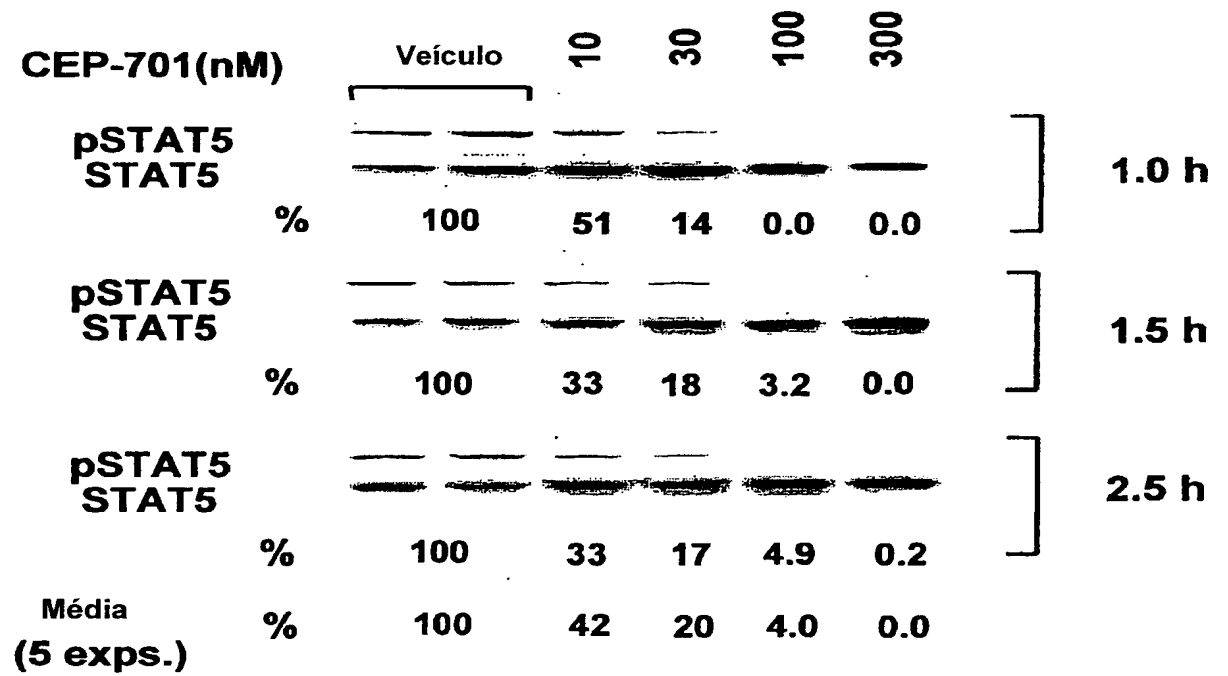


FIGURA 7

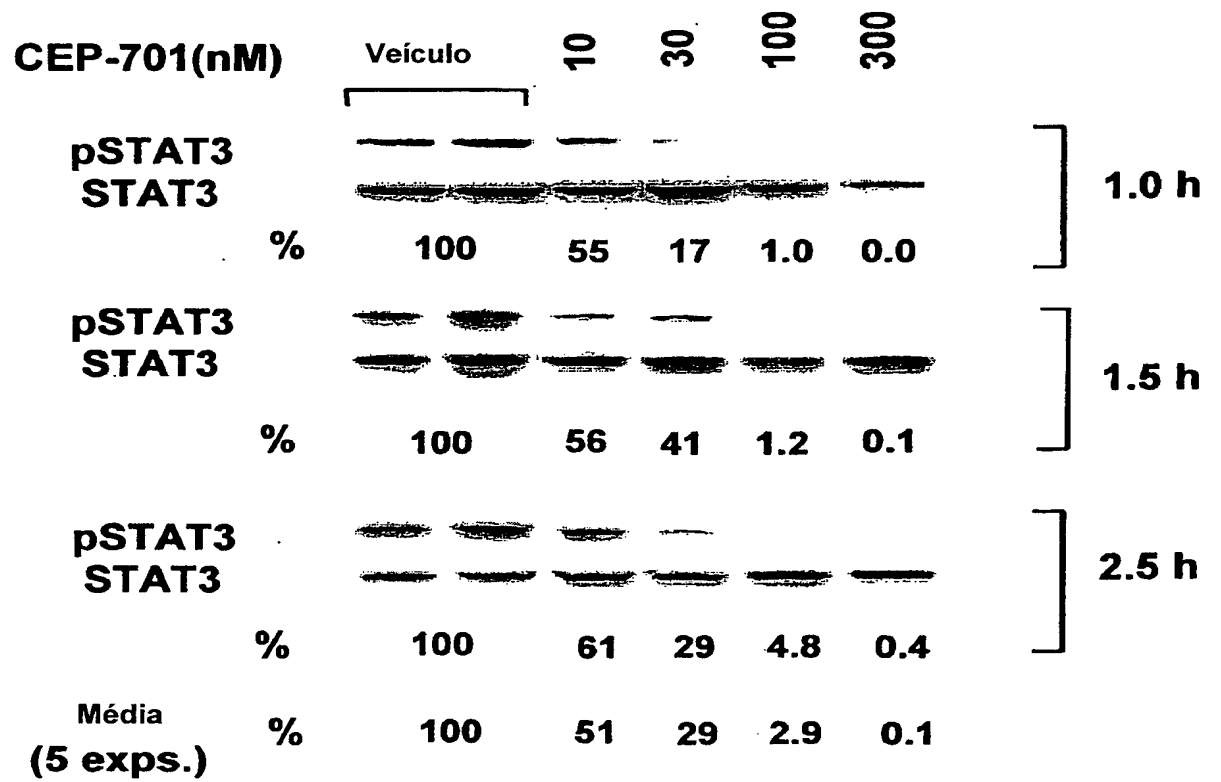


FIGURA 8

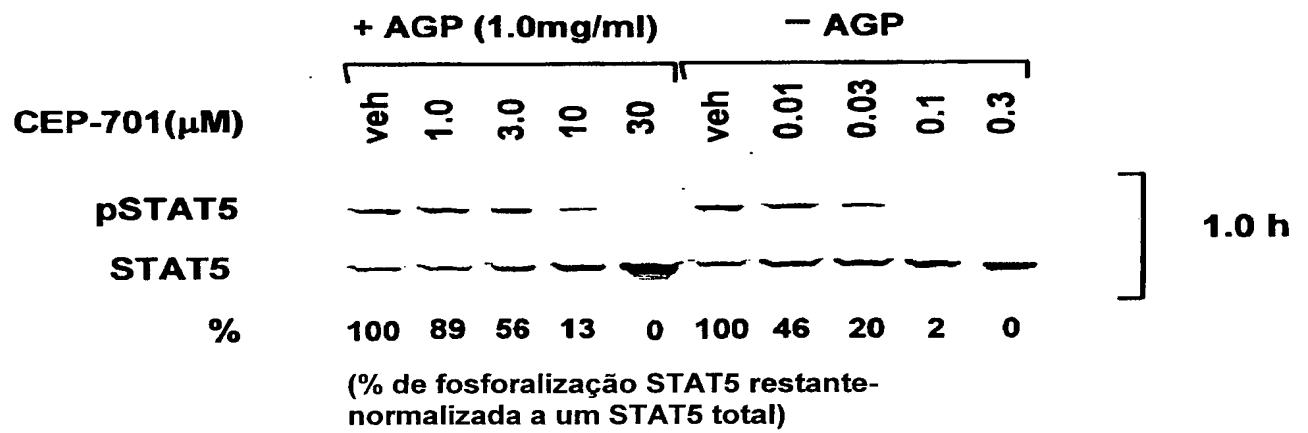
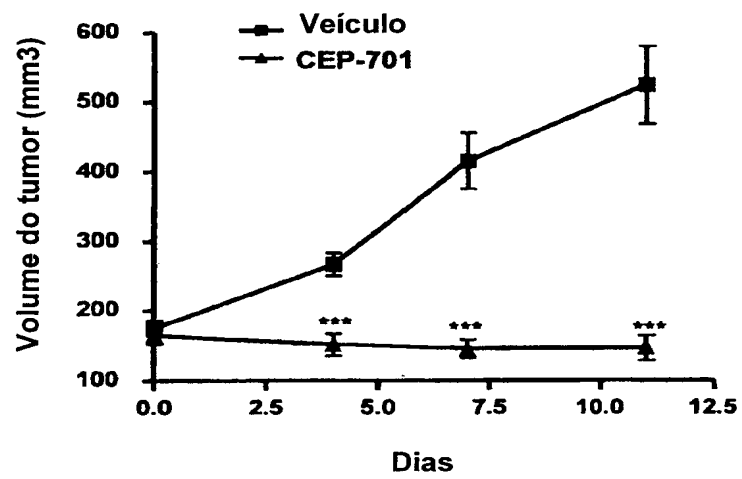
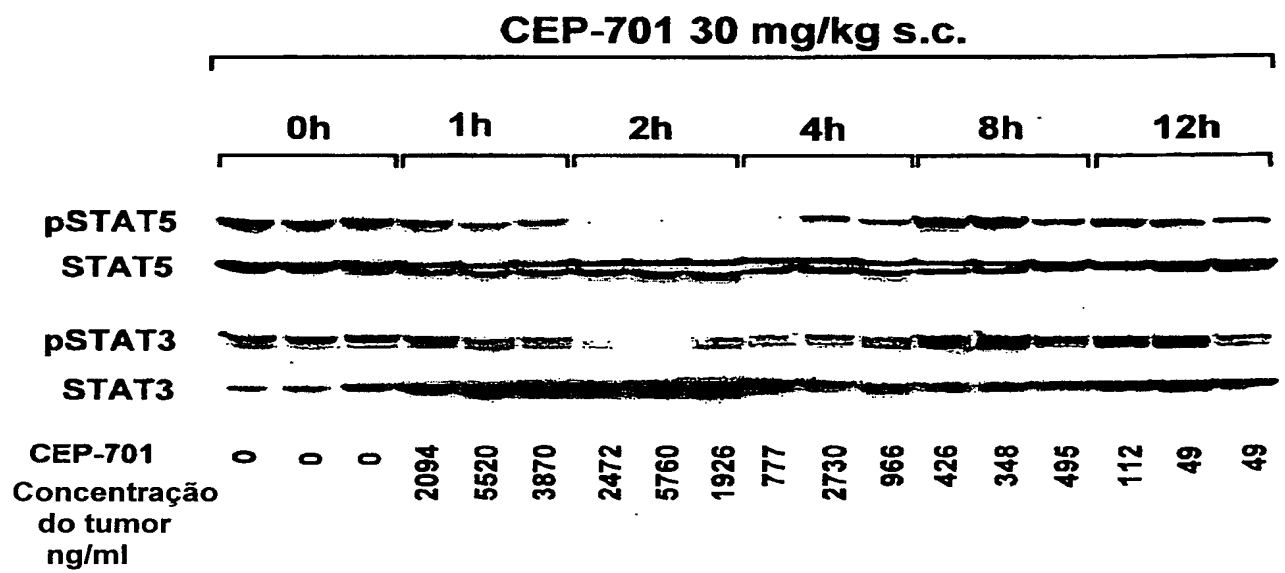


FIGURA 9

A**B****FIGURA 10**

**FIGURA 11**

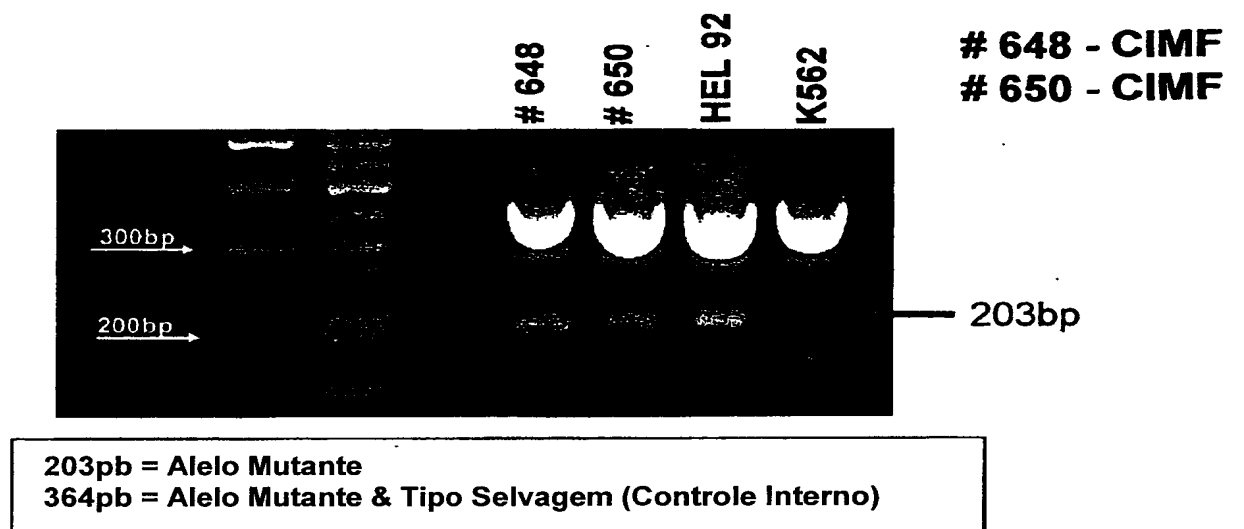
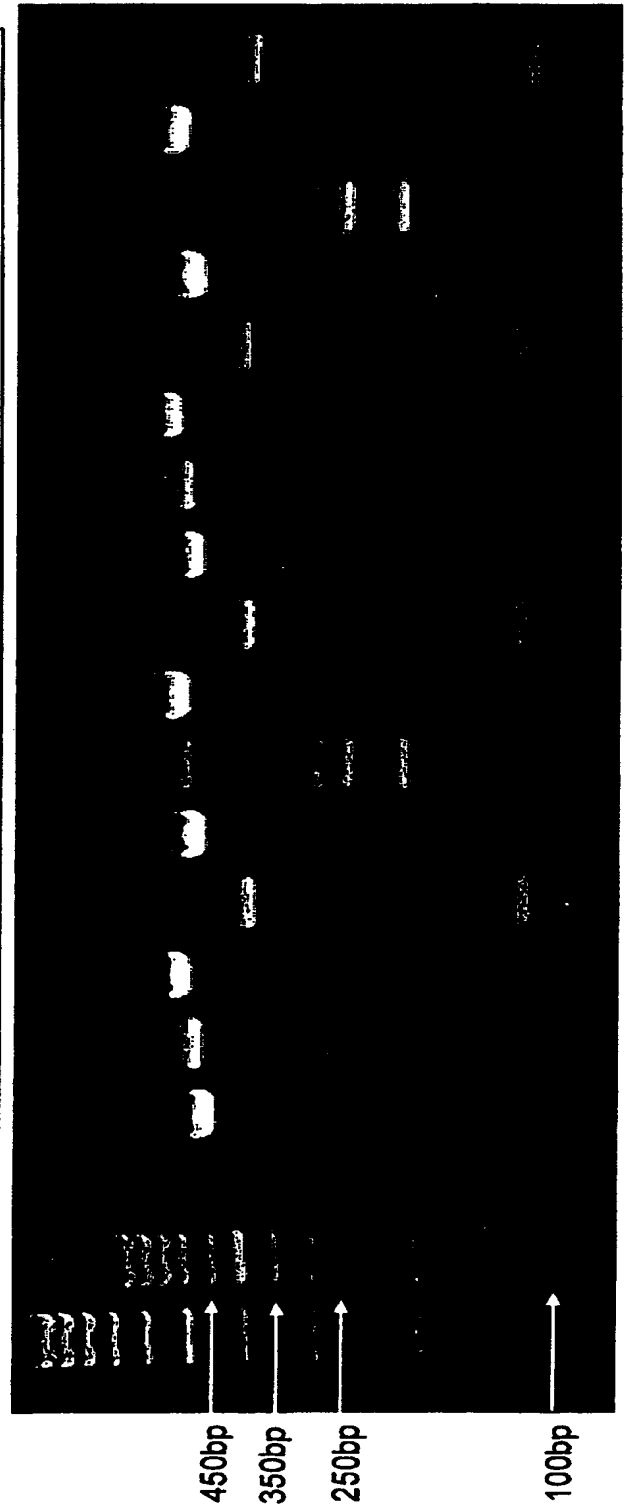


FIGURA 12

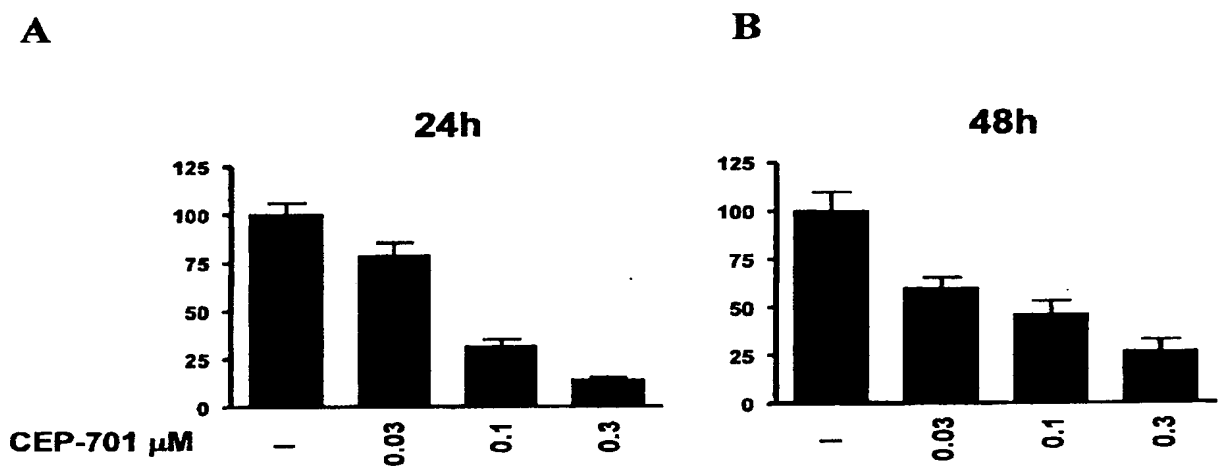
# 648		# 650		HEL 92		K562	
Produto	Produto	Produto	Produto	Produto	Produto	Produto	Produto
PCR JAK	PCR SCL	PCR JAK	PCR SCL	PCR JAK	PCR SCL	PCR JAK	PCR SCL
-	+	-	+	-	+	-	+



Produto PCR JAK2 =460 bp Alelo Mutante = resistente a digestão com BsaXI
Alelo Tipo Selvagem = fragmentos de restrição de 241 pb,189bp e 30 bp

Produto PCR SCL (controle) = 496 pb digeridos em 356, 110 e 30 pb fragmentos de restrição

FIGURA 13

**FIGURA 14**

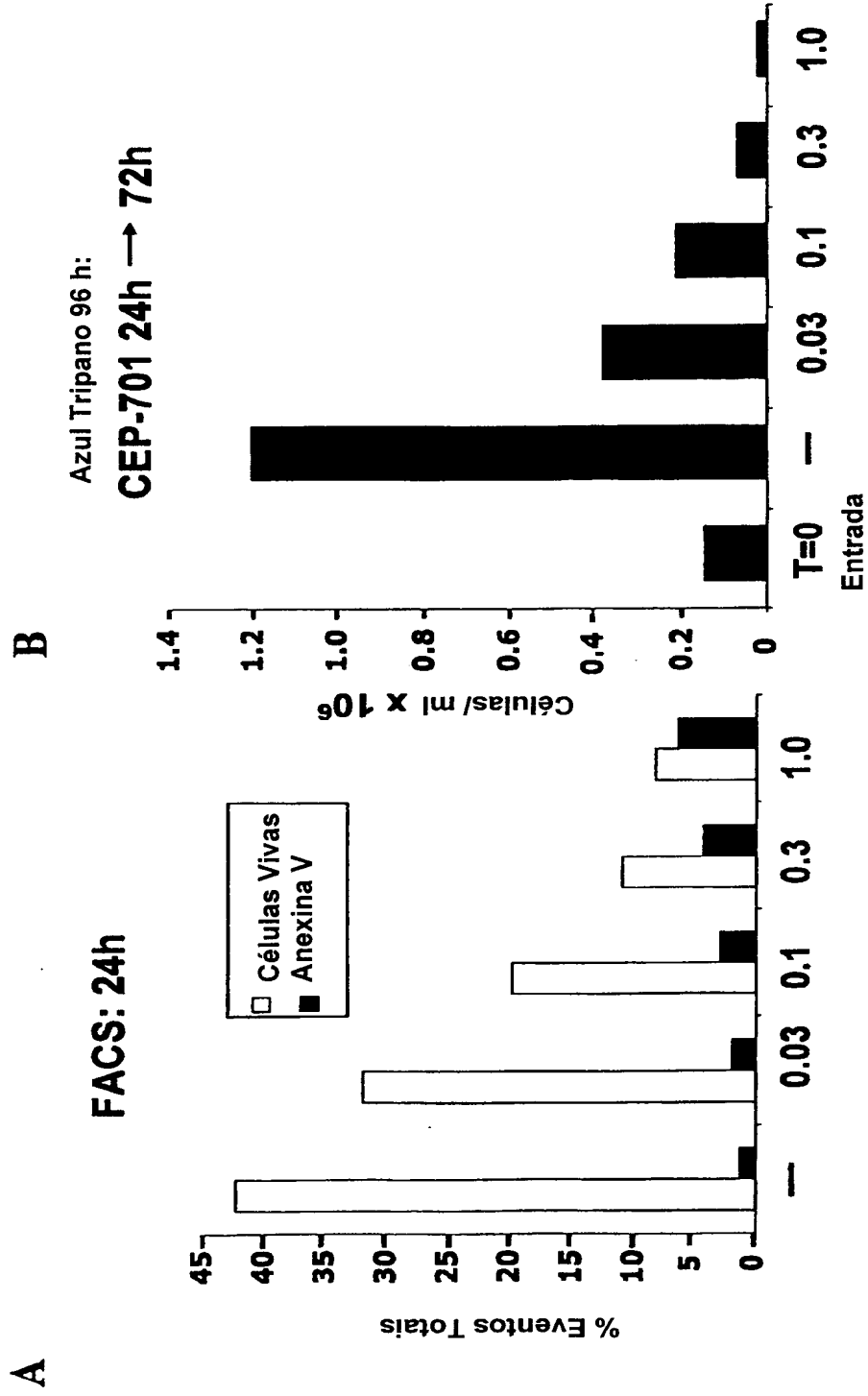


FIGURA 15

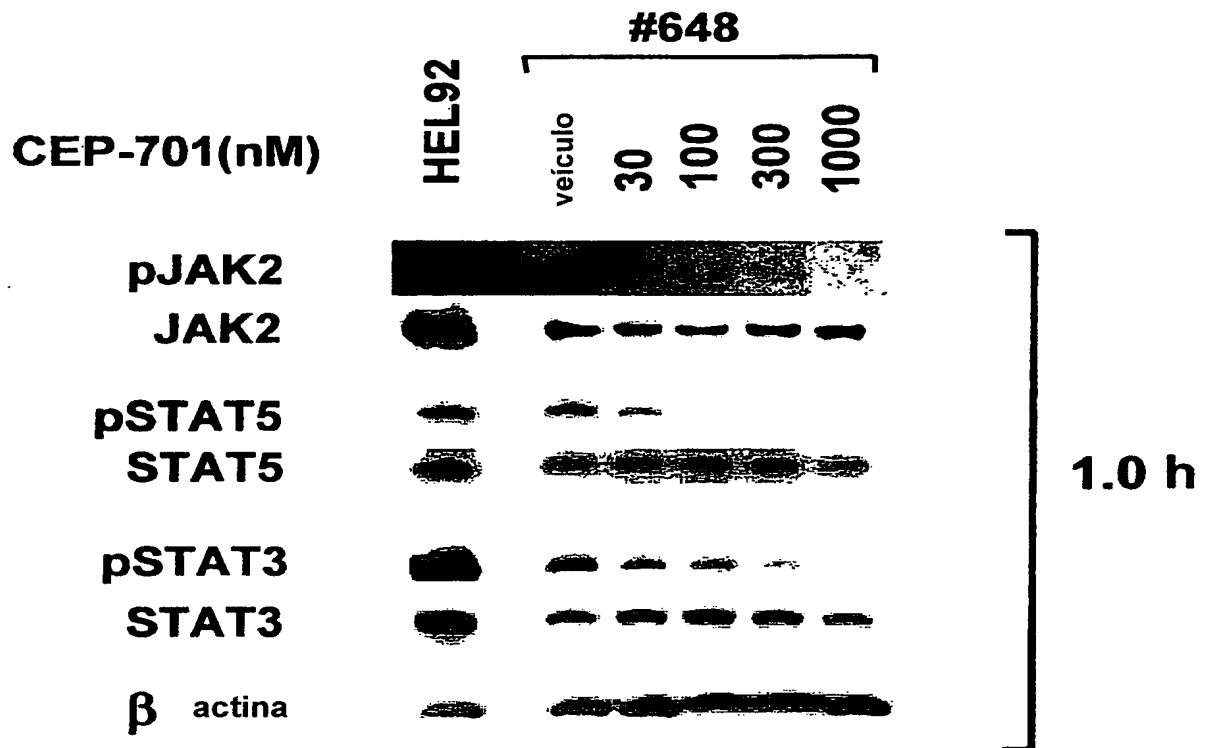


FIGURA 16

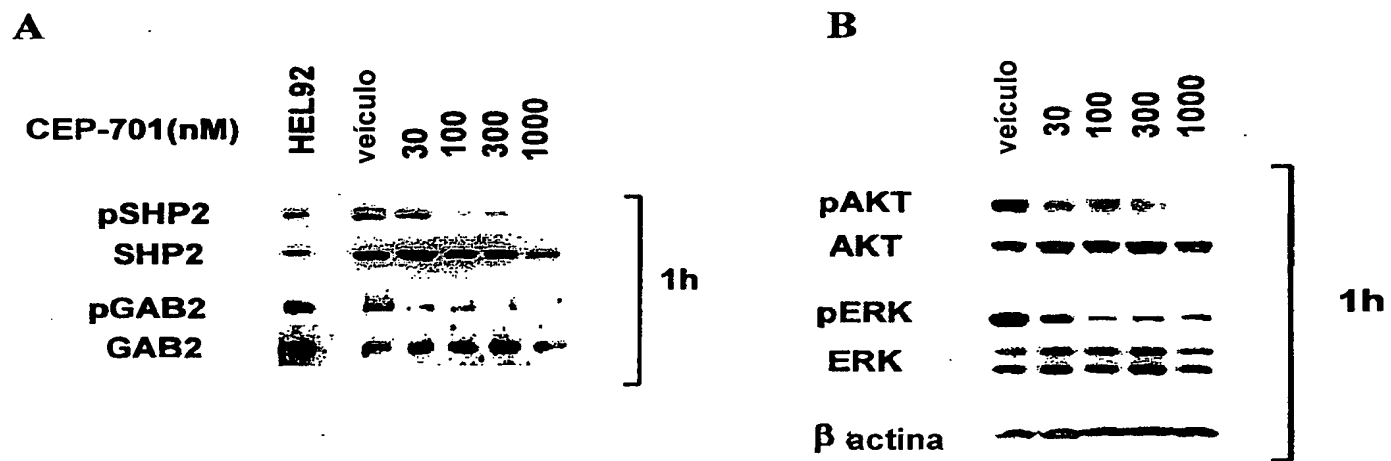


FIGURA 17

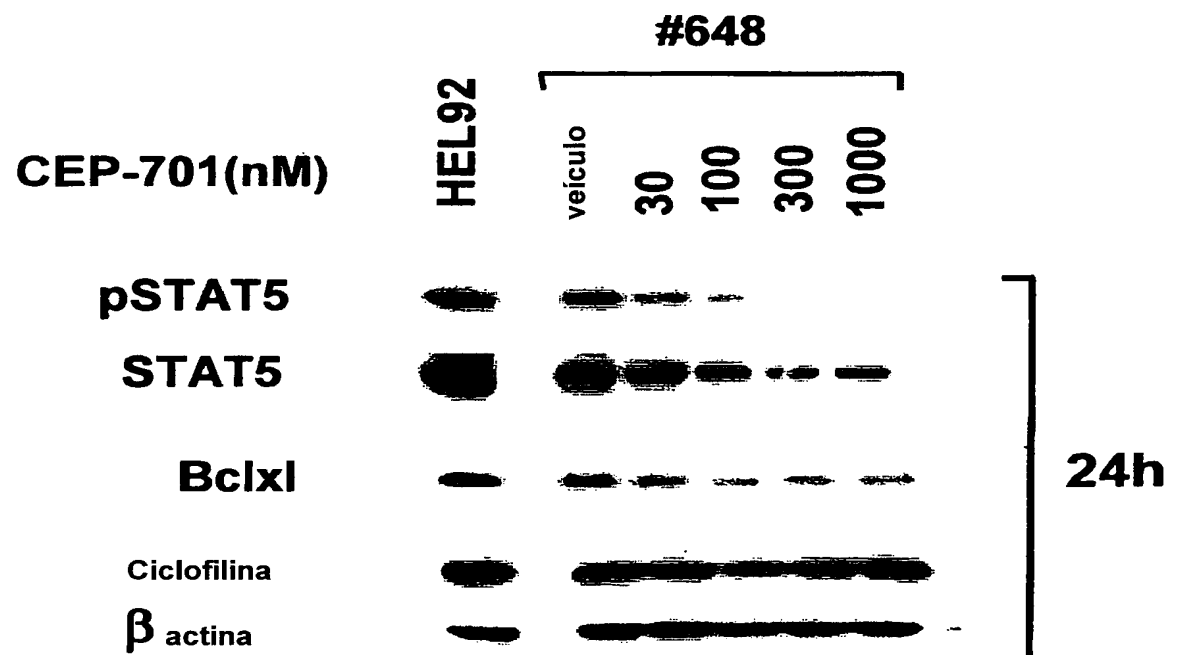


FIGURA 18

RESUMO

“USO DE UM COMPOSTO”

5 A invenção provê um método para tratar distúrbios mieloproliferativos, síndromes mielodisplásticas e outras doenças em um mamífero, em que a ativação de JAK2 contribui para a patologia, compreendendo administrar ao mamífero uma quantidade eficaz de um derivativo de pirrolocarbazol fundido, em que o derivativo de pirrolocarbazol fundido inibe a atividade de JAK2.

LISTAGEM DE SEQUENCIAS

<110> Cephalon, Inc.
 Dobrzanski, Pawel
 Ruggeri, Bruce A.

<120> INIBIDORES DE JAK PARA TRATAMENTO DE DISTÚRBIOS MIELOPROLIFERATIVO

<130> CP418

<140> PCT/US2007/016513
 <141> 2007-07-20

<150> US 11/880,063
 <151> 2007-07-19

<150> US 60/832,627
 <151> 2006-07-21

<160> 8

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> Iniciador de oligonucleotídeo

<400> 1
 ctgaatagtc ctacagtgtt ttcagtttca 30

<210> 2
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> Iniciador de oligonucleotídeo

<400> 2
 agcatttggt tttaaattat ggagtatatt 30

<210> 3
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Seqüência Artificial

<220>
 <223> Iniciador de oligonucleotídeo

<400> 3
 atctatagtc atgctgaaag taggagaaag 30

<210> 4
 <211> 20

<212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador de oligonucleotídeo

<400> 4
 gggtttcctc agaacgttga

20

<210> 5
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador de oligonucleotídeo

<400> 5
 tcattgcttt cctttttcac aa

22

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador de oligonucleotídeo

<400> 6
 tcctggggtc ttctgtcttg

20

<210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Iniciador de oligonucleotídeo

<400> 7
 cctgagaggc aatgggagta

20

<210> 8
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Sequência Artificial

<220>
 <223> Construção Sintética

<400> 8

Glu Gln Glu Asp Glu Pro Glu Gly Asp Tyr Phe Glu Trp Leu Glu
 1 5 10 15