



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

(21) **PI 0713136-4 A2**

(22) Data de Depósito: 12/06/2007  
(43) Data da Publicação: 17/04/2012  
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*  
C07D 217/02  
A61K 31/435  
A61P 35/00  
A61P 31/18

(54) **Título:** INIBIDORES DE AKT (PROTEÍNA QUINASE B)

(30) **Prioridade Unionista:** 20/06/2006 US 60/805,260, 19/01/2007 US 60/885,765, 19/01/2007 US 60/885,765, 20/06/2006 US 60/805,260

(73) **Titular(es):** Eli Lilly And Company

(72) **Inventor(es):** Aktham Aburub, Christopher Randall Schmid, Jenny Pingqi Dai, Michael R. Myers, Renhua Li, Sajan Joseph

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

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2007070945 de 12/06/2007

(87) **Publicação Internacional:** WO 2007/149730de 27/12/2007

(57) **Resumo:** INIBIDORES DE AKT (PROTEÍNA QUÍNASE B). A presente invenção refere-se a 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou a um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou a um hidrato do composto ou ao sal do mesmo como inibidores de AKT que são agentes antineoplásicos e/ou agentes antivirais, bem como composições compreendendo esses compostos e métodos de uso desses compostos.



**PI0713136--4**

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**INIBIDORES DE AKT (PROTEÍNA QUINASE B)**".

A presente invenção refere-se a compostos que são inibidores de Akt, a composições compreendendo esses compostos e a métodos de uso desses compostos.

Antecedentes da Invenção

Proteína quinases estão envolvidas nas vias de transdução de sinal relacionadas a fatores de crescimento, a hormônios e a outras moléculas de regulação celular do crescimento, sobrevivência e metabolismo celular sob condições normais e patológicas. Uma das proteína quinases, proteína quinase B (também conhecida como Akt), é uma serina/treonina quinase que exerce um papel central na promoção da proliferação e sobrevivência de uma ampla faixa de tipos celulares, desse modo, protegendo as células de apoptose (morte celular programada).

Uma série de proteína quinases e fosfatases regulam a atividade de Akt. Por exemplo, ativação de Akt é mediada pela fosfatidilinositol 3-quinase (PI3-K), a qual inicia a ligação de fosfolipídios de segundo mensageiro ao domínio de ligação por homologia de pleckstrina (PH) de Akt. A ligação âncora Akt à membrana plasmática e resulta em fosforilação e ativação da enzima. Amplificações da subunidade catalítica de PI3-K, p110  $\alpha$ , ou mutações na subunidade regulatória PI3-K, p85  $\alpha$ , leva à ativação de Akt em vários tipos de câncer humano. Estudos recentes também demonstraram o papel da via de PI3-K/AKT no ciclo de vida de numerosos vírus.

A WO 01/91754 se refere a inibidores de proteína quinase. A WO 2005/011697 envolve inibidores de proteína quinase A e B. A WO 2005/054202 se refere a inibidores de AKT.

Em virtude de seu papel central na regulação de sobrevivência celular, a Akt proporciona um novo alvo terapêutico para o tratamento eficaz de vários distúrbios, particularmente câncer e infecções virais. Contudo, tal tratamento requer o desenvolvimento de inibidores potentes, seletivos, bio-disponíveis de Akt. Há uma necessidade por inibidores de Akt alternativos. Assim, a presente invenção proporciona novos inibidores de Akt que exibem

potência, seletividade e/ou biodisponibilidade aumentadas, composições compreendendo esses compostos e métodos de uso desses compostos.

Adicionalmente, composições farmacêuticas contendo novos inibidores de Akt quando diluída ou em solução deve ser necessariamente isenta de precipitação de forma a ser distribuída a um paciente. A presente invenção proporciona composições farmacêuticas compreendendo novos inibidores de Akt em faixas particulares de pH que carecem de tal precipitação.

#### Sumário da Invenção

10 A presente invenção proporciona 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo.

A presente invenção também proporciona dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

15 A presente invenção ainda proporciona hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

A presente invenção também proporciona 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

Adicionalmente, a presente invenção proporciona o uso de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma, neuroblastoma, melanoma ou neoplasmas da próstata, mama, ovários, estômago primário, tipo intestinal, endométrio, tireóide, pâncreas, pulmão ou bexiga.

30 A presente invenção também proporciona o uso de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente

aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclórídrico de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma ou neoplasmas da próstata, mama ou ovários.

A presente invenção, adicionalmente, proporciona o uso de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclórídrico de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas ou glioblastoma.

A presente invenção ainda proporciona o uso de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclórídrico de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de hepatite C, rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B ou citomegalovírus humano (HCMV).

Adicionalmente, a presente invenção proporciona 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclórídrico de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para o tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma, neuroblastoma, melanoma ou neoplasmas da próstata, mama, ovários, estômago primário, tipo intestinal, endométrio, tireóide, pâncreas, pulmão ou bexiga.

A presente invenção também proporciona 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do

mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para o tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma ou neoplasmas da próstata, mama ou ovários.

A presente invenção, adicionalmente, proporciona 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para o tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas ou glioblastoma.

A presente invenção ainda proporciona 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, para o tratamento de hepatite C, rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B ou citomegalovírus humano (HCMV).

A presente invenção, adicionalmente, proporciona um método de tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma, neuroblastoma, melanoma ou neoplasmas da próstata, mama, ovários, estômago primário, tipo intestinal, endométrio, tireóide, pâncreas, pulmão ou bexiga em um paciente que precisa do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

A presente invenção também proporciona um método de tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma ou neoplasmas da próstata, mama ou ovários em um paciente

que precisa do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclóridato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

A presente invenção, adicionalmente, proporciona um método de tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas ou glioblastoma em um paciente que precisa do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclóridato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

A presente invenção ainda proporciona um método de tratamento de hepatite C, rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B ou citomegalovírus humano (HCMV) em um paciente que precisa do mesmo compreendendo a administração de uma quantidade eficaz de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclóridato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

A presente invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclóridato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol e um veículo, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável.

A presente invenção, adicionalmente, proporciona uma composição farmacêutica liofilizada compreendendo 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-

isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclórídato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol e um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável em que o pH da referida composição, quando diluída com diluente aquoso, é menor do que 4,2 e maior do que 2,0, menor do que 3,2 e maior do que 2,0 ou menor do que 2,8 e maior do que 2,0.

A presente invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo, incluindo dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou hemihidrato de monoclórídato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol e um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável em solução em que o pH da referida composição é menor do que 4,2 e maior do que 2,0, menor do que 3,2 e maior do que 2,0 ou menor do que 2,8 e maior do que 2,0.

A presente invenção ainda proporciona hemihidrato de monoclórídato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol na forma cristalina tendo um padrão de difração de pó por raios X com picos de intensidade a  $2\theta = 4,9, 14,8$  e  $10,2$ .

A presente invenção também proporciona 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um hidrato do mesmo.

#### 25 Descrição Detalhada da Invenção

Compostos da presente invenção são inibidores de Akt e acredita-se que sejam úteis no tratamento de distúrbios relacionados à atividade de Akt. Assim, compostos da presente invenção são agentes antineoplásicos e/ou antivirais.

30 Os compostos da presente invenção são úteis para o tratamento de neoplasmas que exibem defeitos na PTEN, neoplasmas com atividade desregulada de PI3 quinase ou neoplasmas que exibem atividade elevada

de Akt. Acredita-se que inibidores de Akt sejam úteis no tratamento de mieloma múltiplo (Hsu e outros, *Blood* (2001) 98(9) 2853-2855); câncer de pulmão de células não-pequenas (Balsara, *Carcinogenesis* (2004) 25(11) 2053-2059); glioblastoma (Koul e outros, *Mol. Cancer Ther.* (2006) 5: 637-644); neuroblastoma (Li e outros, *Cancer Res.* (2005) 65(6), 2070-2075); melanoma (Dai e outros, *J. of Clin. Oncology* (2005) 23(7), 1473-1482) e neoplasmas da próstata (Majumder e outros, *Oncogene* (2005) 24, 7465-7474); mama (Tokunaga e outros, *J. of Clin. Oncology* (Meeting Abstracts) (2005) 23(16S), 9500); ovários (Cheung e outros, *PNAS* (1992) 89, 9267-9271; Yuan e outros (2000); Hu e outros (2000)); estômago primário ou do tipo intestinal (Ang e outros, *Cancer Lett.* (2005) 225(1), 53-59); endométrio (Jin e outros, *British J. of Cancer* (2004) 91 1808-1812); tireóide (Ringel e outros, *Cancer Res.* (2001) 61(16), 6105-6111; De Vita e outros, *Cancer Res.* (2000) 60, 3916-3920); pâncreas (Schliemen e outros, *Brit. J. of Cancer* (2003) 89, 2110-2115); pulmão (Mansion e outros, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* (2004) 170, 1088-1094); ou bexiga (Rieger-Christ e outros, *Oncogene* (2004) 23(27), 4745-4753). Também acredita-se que inibidores de Akt sejam úteis no tratamento de vírus, tais como hepatite C e NS5A de hepatite C (Mannova e outros, *J. Virol.* (2005) 79(14), 8742-8749; He e outros (2002)); rubéola (Cooray e outros, *Virology J.* (2005) 2(1), 1-12); proteína Tat do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Borgatti e outros (1997)); Proteína X de hepatite B (Lee e outros (2001)) ou citomegalovírus humano (HCMV) (Johnson e outros (2001)).

4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol forma sais de adição de ácido farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, com os sais fisiologicamente aceitáveis os quais são freqüentemente usados em química farmacêutica. Tais sais também são parte da presente invenção. Sais farmacologicamente aceitáveis e metodologia comum para a preparação dos mesmos são bem conhecidos na técnica. Veja, por exemplo, P. Stahl e outros, *Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, Selection and Use*, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); S.M. Berge e outros, "Pharmaceutical Salts," *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol. 66, No. 1, Janeiro de 1977.

Sais preferíveis para 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol incluem o monoclóridato e dicloridrato.

Os intermediários descritos aqui podem formar sais.

Além de sais, os compostos da presente invenção e os intermediários descritos aqui podem formar um hidrato ou um hidrato do sal farmacologicamente aceitável.

Um composto preferível é 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol. Ainda outro composto preferível é dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol. Um composto mais preferível é hemihidrato de monoclóridato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.

Conforme usado aqui, o termo "paciente" se refere a um mamífero que está sofrendo de um ou mais distúrbios associados a uma atividade elevada de Akt. Deve ser entendido que o paciente mais preferido é um ser humano. Também deve ser entendido que a presente invenção se refere especificamente à inibição de Akt/PKB de mamífero.

Os termos "tratamento", "tratar", "tratando" e similares se destinam a incluir efeitos tais como diminuição e/ou inibição do crescimento de neoplasmas, a amplificação e/ou superexpressão de Akt1, Akt2 e/ou Akt3, proliferação e sobrevivência celular e/ou replicação viral.

Conforme usado aqui, o termo "quantidade eficaz" se refere a uma quantidade que inibe a Akt até um ponto que proporciona um efeito farmacológico.

A presente invenção também proporciona uma composição farmacêutica compreendendo 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo ou hidrato do mesmo e um veículo, diluente ou excipiente farmacologicamente aceitável. Composições farmacêuticas para a presente invenção incluem formas antes da diluição, tal como uma forma liofilizada, e formas subsequentes à diluição, tal como uma forma pronta para administração a um paciente. O pH dessas composições farmacêuticas é de menos de cerca de 4,2 a mais de cerca de 2,0. Mais preferivelmente, o pH é de menos de cerca de 3,2 a mais de cerca

de 2,0. O pH mais preferível é de menos de cerca de 2,8 a mais de cerca de 2,0. Um "veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável" é um meio geralmente aceito na técnica para a distribuição de agentes biologicamente ativos a pacientes, por exemplo, mamíferos, de preferência seres humanos. Tais veículos, diluentes ou excipientes são geralmente formulados de acordo com uma série de fatores bem dentro da visão versados na técnica para determinar e serem considerados. Esses incluem, sem limitação: o tipo e a natureza do agente ativo que está sendo formulado; o indivíduo ao qual a composição contendo agente tem de ser administrada; a via de administração pretendida da composição; e a indicação terapêutica que está sendo objetivada. Veículos e excipientes farmacêuticamente aceitáveis incluem meios líquidos aquosos e não-aquosos, bem como uma variedade de formas de dosagem sólidas e semi-sólidas. Tais veículos, diluentes ou excipientes podem incluir uma série de diferentes ingredientes e aditivos em adição ao agente ativo, tais como os ingredientes adicionais que estão sendo incluídos na formulação por uma variedade de razões, por exemplo, estabilização do agente ativo, bem conhecidas por aqueles versados na técnica. Descrições de veículos, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis adequados e fatores envolvidos em sua seleção são encontrados em uma variedade de fontes prontamente disponíveis. Veja, por exemplo, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (A. Gennaro e outros, eds., 19<sup>a</sup> ed., Mack Publishing Co., 1995).

Os compostos da presente invenção podem ser administrados sistemicamente, tal como intravenosamente (por exemplo, através de bolo ou infusão), em formulações de unidade de dosagem de composições farmacêuticas contendo veículos, diluentes ou excipientes farmacêuticamente aceitáveis não-tóxicos convencionais.

Para composições farmacêuticas de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, o ingrediente ativo comumente estará presente em uma quantidade de cerca de 0,5 a 95% em peso, baseado no peso total da composição. Revestimentos apropriados podem ser aplicados para aumentar a palatabilidade ou retardar a adsorção.

As quantidades terapêuticamente eficazes dos compostos da invenção para o tratamento dos distúrbios descritos aqui em um paciente podem ser determinadas em uma variedade de formas conhecidas por aqueles versados na técnica. Deve ser entendido, contudo, que os níveis de dose específicos para qualquer paciente em particular dependerão de uma variedade de fatores, incluindo a atividade do composto específico empregado, a idade, peso corporal, saúde geral, sexo, dieta, momento de administração, via de administração e taxa de excreção, combinação de fármaco e a gravidade da doença em particular. A frequência de dosagem também pode variar dependendo do composto usado e da doença tratada em particular. Por exemplo, uma dose diária típica pode conter de cerca de 1 mg a cerca de 1 g do ingrediente ativo.

Os compostos da presente invenção podem ser preparados empregando a informação fornecida aqui, além de outras manipulações padrões que são conhecidas na literatura ou exemplificadas nos procedimentos experimentais.

Os termos e abreviações usados aqui têm seus significados normais, a menos que de outro modo designado. Por exemplo, "LC" se refere a cromatografia de líquido; "dppb" se refere a bis(difenilfosfina)butano; Pd(OAc)<sub>2</sub> se refere a acetato de paládio; "DMF" se refere à N,N-dimetilformamida; "DMSO" se refere a sulfóxido de dimetila; "Et<sub>2</sub>O" se refere a dietil éter; "EtOAc" se refere a acetato de etila; "TFA" se refere a ácido trifluoroacético; MeOH se refere a metanol.

### Preparações

#### 25 Preparação 1

dicloridrato de 2-[7-(4-Metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonil]-etilamina

Tratar uma pasta fluida fluida de terc-butil éster de ácido {2-[7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonil]-etil}-carbâmico (11,00 g, 24,85 mmols) em MeOH anídrico (150 mL) com HCl a 4N em dioxano (350 mL). Agitar a mistura de reação resultante em temperatura ambiente durante a noite, então, concentrar *in vacuo* para ½ do volume e tratar com EtOAc em excesso, fazendo com que um sólido amarelo se precipite. Recuperar o sólido resul-

tante através de filtração a vácuo sob uma atmosfera de N<sub>2</sub>; lavar com EtO-Ac e secar sob vácuo (sob uma atmosfera de N<sub>2</sub>) para proporcionar o composto do título (10,23 g, rendimento de 99 %) como um sólido amarelo: MS (ES): m/z 343,0 (M<sup>+</sup>+H).

## 5 Preparação 2

### Ácido 7-Bromo-isoquinolina-5-sulfônico

Adicionar H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fumegante (2.000 mL, 21,33 mols; 26-29,5 % isento de SO<sub>3</sub>) a um frasco de fundo redondo de 5-L equipado com um agitador mecânico, condensador de refluxo, tubulação de N<sub>2</sub> e termômetro. Esfriar o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> fumegante para ~10 °C com um banho de gelo/acetona, então, adicionar HCl de 7-bromoisoquinolina (500,00 g, 2,04 mols) aos poucos, mantendo a temperatura da mistura de reação abaixo de ~15-20 °C. Quando de adição completa de HCl de 7-bromoisoquinolina, aquecer a mistura de reação resultante para ~100 °C durante a noite. Esfriar a mistura de reação para temperatura ambiente, então, entornar em uma solução agitada de H<sub>2</sub>O gelada. Recuperar a precipitação resultante através de filtração a vácuo, lavando com H<sub>2</sub>O, então Et<sub>2</sub>O, e secar sob filtração a vácuo, seguido por secagem em um forno sob pressão reduzida a ~35 °C para proporcionar o composto do título (501,42 g, rendimento de 85 %) como um sólido esbranquiado. TOF-MS [ES+; m/z] 287,9331/287,9330.

## 20 Preparação 3

### Ácido 7-(4-(Metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfônico

Tratar uma solução de ácido 7-bromo-isoquinolina-5-sulfônico (150,00 g, 0,520 mols) e ácido 4-metoxifenilborônico (90,87 g, 0,598 mols) em DMF (1.400 mL) e MeOH (375 mL) com Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso a 2M (652 mL). Desoxigenar a pasta fluida resultante 3X com N<sub>2</sub>, então, adicionar Pd(OAc)<sub>2</sub> (2,33 g, 0,0104 mols) e dppb (5,54 g, 0,0130 mols). Aquecer a mistura de reação resultante a ~70 °C durante 3 horas, então, deixar esfriar para a temperatura ambiente durante a noite. Diluir a mistura de reação com H<sub>2</sub>O (4.000 mL) e ajustar o pH para um pH de ~2 com HCl aquoso a 5N. Deixar a pasta fluida resultante agitar em temperatura ambiente durante 30 min, então, recuperar o sólido marrom através de filtração a vácuo, lavando

com H<sub>2</sub>O e secando sob filtração a vácuo. Dissolver o sólido marrom em DMF (1.000 mL) e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso a 2M (650 mL) e filtrar a solução resultante através de uma almofada de Celite ®, lavando com DMF (400 mL)/H<sub>2</sub>O (400 mL). Tratar o filtrado com HCl aquoso a 5N para ajustar o pH para um

5 pH de ~2. Deixar a pasta fluida resultante agitar em temperatura ambiente durante 30 min, então, recuperar o sólido através de filtração a vácuo, lavando com H<sub>2</sub>O e secando sob filtração durante a noite. Dissolver o sólido em DMF (1.000 mL) e Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aquoso a 2M (1.000 mL) novamente e tratar a solução resultante com Celite ® para criar uma pasta fluida. Agitar a pasta

10 fluida resultante em temperatura ambiente durante 30 min, então, filtrar através de uma almofada de Celite ®, lavando com H<sub>2</sub>O. Tratar o filtrado com HCl aquoso a 5N para ajustar o pH para um pH de ~2. Agitar a pasta fluida resultante durante 30 min, então, recuperar o sólido através de filtração a vácuo, lavando com H<sub>2</sub>O e secando sob filtração a vácuo durante a noite.

15 Triturar o sólido, então, lavar com EtOAc, secando sob filtração a vácuo durante a noite, seguido por secagem em um forno sob pressão reduzida a ~35 °C para proporcionar o composto do título (136,79 g, rendimento de 83 %) como um sólido amarelo: TOF-MS [ES<sup>+</sup>; m/z] 316,0624/316,0643. Anal. Calcd. para C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>4</sub>S: C 60,94; H 4,15; N 4,44; S 10,16. Encontrado C

20 60,76; H 4,13; N 4,50; S 9,90.

#### Preparação 4

Cloreto de 7-(4-Metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonila

A uma pasta fluida de ácido 7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfônico (12,13 g, 38,5 mmols) em 1,2-dicloroetano (200 mL) e DMF (2,99

25 mL, 38,5 mmols) adicionar cloreto de oxalila (26,8 mL, 308 mmols) gota a gota. Agitar mecanicamente a pasta fluida sob atmosfera de nitrogênio enquanto aquece a 60-65 °C durante 4 horas. Esfriar a pasta fluida para -10 °C. Esperar durante 30 min, então, filtrar. Lavar o sólido amarelo com éter a

30 20%/diclorometano e secar sob uma atmosfera de nitrogênio para proporcionar o composto do título (14,8 g) como um pó amarelo.

#### Preparação 5

Sal de sódio de 7-(4-Metóxi-fenil)-isoquinolina-5-tiol

A. A uma pasta fluida de cloreto de 7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonila (4,0 g, 12 mmols) em dioxano (40 mL), adicionar cloridrato de tricarbóxi etil fosfina (13,73 g, 48 mmols) e água (10 mL). Aquecer a mistura para 100 °C e agitar durante 3 horas. Esfriar a mistura em um banho de gelo e adicionar NaOH (5 N, 60 mL) lentamente via uma pipeta. Filtrar e secar ao ar o precipitado sólido amarelo para proporcionar o composto do título (3,2 g, 95 %). Espectro de massa (LCMS) m/z = 266,2 (M-Na<sup>+</sup>).

Alternativamente, o composto do título pode ser feito como segue:

B. (i) Desoxigenar uma solução de ácido 7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfônico (100,00 g, 0,317 mol) em tolueno anídrico (2.500 mL) 3X com N<sub>2</sub>, então, tratar com Ph<sub>3</sub>P (332,58 g, 1,268 mol), I<sub>2</sub> (80,46 g, 0,317 mol) e Bu<sub>3</sub>N (152,00 mL; 0,638 mol). Deixar a mistura de reação resultante em refluxo durante 1 hora sob N<sub>2</sub>, então, esfriar para a temperatura ambiente durante a noite enquanto borbulha ar na mistura de reação. Tratar a mistura de reação com uma solução aquosa de NaOH a 1N (500 mL), então, agitar a mistura de reação resultante em temperatura ambiente durante a noite enquanto borbulha ar na mistura de reação. Recuperar o precipitado castanho resultante através de filtração a vácuo. Lavar com uma solução a 1/1 de THF/Et<sub>2</sub>O, então, secar sob filtração a vácuo para proporcionar bis-(7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5)-dissulfeto (72,50 g, rendimento de 86 %) como um sólido castanho-claro: <sup>1</sup>H RMN(400 MHz, DMSO) δ 9,39 (s, 2H), 8,51 (d, 2H), 8,41 (s, 2H), 8,11 (d, 2H), 8,00 (d, 2H), 7,53 (d, 4H), 6,94 (d, 4H), 3,78 (s, 6H).

B. (ii.) Tratar uma pasta fluida de bis-(7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5)-dissulfeto em THF anídrico (850 mL) com NaBH<sub>4</sub> (2,84 g, 75,07 mmols). Aquecer a mistura de reação resultante a ~35 °C sob N<sub>2</sub> durante ~1 hora, então, aquecer a ~45 °C sob N<sub>2</sub> durante 1 hora.

### Preparação 6

Sulfinato de 7-(4-Metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sódio

A cloreto de 7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonila (1,48 g, 4 mmols) em água (10 mL), adicionar Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (1,01 g, 8 mmols) e NaHCO<sub>3</sub>

(1,01 g, 12 mmols). Aquecer a mistura para 100 °C e agitar durante 1 hora. Esfriar a mistura de reação para a temperatura ambiente e remover a água sob pressão reduzida. Adicionar metanol (40 mL) ao resíduo, agitar durante 10 min. Filtrar o sólido branco, lavar com metanol e combinar os filtrados.

5 Concentrar para proporcionar o composto do título (1,1 g).

#### Preparação 7

Amina (3,5-dicloro-benzilideno)-(2,2-dietoxi-etil)

2,2-dietoxi-etilamino (1852,5g; 1 equivalente; 13,63 moles), 3,5-dicloro-benzaldeído (2.453g; 1 equivalente; 13,60 moles), e tolueno (12L) são colocados em um balão de 22L equipado com uma trava "Dean Stark", condensador, entrada de nitrogênio, agitação superior ("overhead") e termopar. A reação amarela claro é aquecida até o refluxo. O solvente começa a destilar em 88°C. Um total de aproximadamente 650ml destilam (aproximadamente 240ml de água) e são coletados. A temperatura é aumentada até 114°C durante a destilação. NMR depois de 2h em refluxo mostra o produto. O calor é desligado após 2,5h. A solução é filtrada por gravidade para dentro de um recipiente próprio para líquidos corrosivos ("carboy") através de filtros de papel canelado para remoção de alguns particulados (incluindo uma pequena seção do tubo de vidro, o qual é muito provavelmente do 3,5-dicloro-benzaldeído). A solução filtrada é concentrada usando frasco Buchi com banho de água a 45°C. Uma vez que o solvente acaba de passar a temperatura é aumentada para 70°C com vácuo direto, e mantida por aproximadamente 1,5h para remover qualquer resíduo de tolueno. O peso da amina (3,5-dicloro-benzilideno)-(2,2-dietoxi-etil) é 4.059,3g (102,9% do teórico). Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 291,2$  ( $M+H^+$ ).

#### Preparação 8

Cloridrato de 5,7-dicloro-isoquinolina

Ácido triflico (2,97L; 33,52 moles; 5,03Kg) é colocado em um balão de 12L equipado com uma trava "Dean Stark", agitação superior ("overhead"), condensador, entrada de nitrogênio, 3L de funil de adição (adicionado de um frasco, via condensação), e um termopar. O ácido triflico é aquecido a 120°C. Amina (3,5-dicloro-benzilideno)-(2,2-dietoxi-etil) (1350,5g;

1 equivalente; 4,65 moles) é diluída com diclorometano (1350L) e colocada para ser adicionada no funil. A adição é iniciada com temperatura em 119°C. A adição é finalizada depois de 90min em que a temperatura é mantida em 120°C. Aproximadamente 1500mL de destilado é coletado durante a adição.

5 % de área de HPLC 45 min após a adição ter terminado indica 94,14% de produto e 4,86% de Amina (3,5-dicloro-benzilideno)-(2,2-dietoxi-etil). O calor é desligado depois de 1,5h. A reação é resfriada a aproximadamente 80°C. Neste ponto, o frasco é colocado em um banho de água gelada e é resfriado em seguida. Adiciona-se metanol (2,7L) com a reação a 9°C. A adição é fi-

10 nalizada após 60min. A temperatura máxima é de 27°C. Alguns sólidos são formados durante a adição do metanol. Esta lama é transferida em porções para um funil de adição de 2L e é adicionada a uma solução de hidróxido de amônia (5,1L; 36,67 moles; 4,59Kg) e água (5,1L) em um frasco de 22L, resfriado em água com temperatura inferior a 2°C. O funil de adição tem um

15 tubo de extensão Teflon® para evitar que o material escorra para o lado do frasco, o que pode levar a aderência de mais sólidos oleosos nas paredes do frasco. O material é aderido em pequenas porções para evitar que o funil de adição fique obstruído devido aos sólidos. A adição é finalizada após 35min incluindo uma lavagem de metanol (900mL) tanto no frasco como no

20 funil de adição. A temperatura máxima é de 26°C. Um sólido marrom é formado. A lama é resfriada a 14°C. O sólido é filtrado em um suporte de polipropileno. O sólido é lavado com 2 x 4 L e 1 x 2 L de água. O sólido é seco à vácuo a 50°C até um peso de 999,0g (108,4% do teórico). O 5,7-dicloroisoquinolina (997g; 1 equivalente; 5,03moles) e etanol (14,97L) são coloca-

25 dos em um frasco de 22L equipado com funil de adição, entrada de nitrogênio, agitação superior ("overhead") e um termopar. A lama marrom é agitada em temperatura ambiente (22°C). O cloreto de acetila (1180mL; 16,58 moles; 1,30Kg) é colocado em um funil de adição. É adicionado em gotas no frasco. A lama marrom escurece. O sólido parece praticamente dissolver

30 pela adição de 100-200mL de cloreto de acetila. Uma solução completa não se forma. Os sólidos reaparecem conforme a adição continua. A adição é finalizada após 45min. A temperatura máxima é de 43°C, a qual é alcançada

quase na metade do caminho da adição e é mantida com banho de água fria. Uma amostra da reação é removida após aproximadamente  $\frac{3}{4}$  do cloreto de acetila ser adicionado no NMR. Desde que a amostra pareça ser o sal, cloreto de acetila em excesso não é requerido. A lama é agitada e deixada resfriar. Após 45 min a temperatura é de 30°C. A lama é resfriada a menos de 2°C e é mantida por 1,5h em banho de água fria. A lama é filtrada. O sólido é lavado com 2 x 1,3 L de etanol resfriado. O peso do bolo molhado é de 811,4g. O sólido é seco à vácuo a 50°C. O peso seco é de 648,4g. Isto representa um rendimento de 61%. Espectro de massa (LCMS) m/z = 199,05 (M+H<sup>+</sup>).

### Preparação 9

Terc-butil éster de ácido [2-(7-Cloro-isoquinolin-5-il-sulfanil)-etil]-carbâmico

Carbonato de potássio (1952 g; 14,12 mols) é carregado a um frasco de 22 L equipado com agitação superior ("overhead"), funil de adição, entrada de nitrogênio e termoacoplador. Dimetilformamida (4 L) é adicionada. O cloridrato de 5,7-dicloro-isoquinolina (646,1 g; 1,00 equiv; 2,76 mols) é adicionado aos poucos e junto com DMF (330 mL). A Boc-Cisteamina (514 g; 1,05 equiv; 2,90 mols) é dissolvida em dimetilformamida (1520 mL) e é carregada ao funil de adição. A mistura é aquecida para 60°C. Nitrogênio é purgado através do "headspace" durante 15 minutos, enquanto a mistura é aquecida. A solução de Boc-Cisteamina é adicionada durante 2 horas e 15 minutos a 60°C. HPLC 1 hora e 20 minutos após a adição indica 28,1 % de material de partida, 67,26 % de produto, 4,22 % de isômero e 0,25 % de bis. A reação é aquecida para 75°C. Os dados de HPLC na Tabela A são coletados a 75°C.

Tempo a 75°C	% de HCl de 5,7-dicloro-isoquinolina	% de terc-butil éster de ácido [2-(7-Cloro-isoquinolin-5-il-sulfanil)-etil]-carbâmico	% de isômero	% de bis substituído
30 minutos	2,75	90,27	5,54	1,44
1 hora	0,93	91,39	5,52	2,16
1,5 hora	0,20	91,25	5,32	3,23

Tabela A. Dados de HPLC da reação para a preparação de terc-butil éster de ácido [2-(7-cloro-isoquinolin-5-il-sulfanil)-etil]-carbâmico

Após 1,5 hora, a manta é substituída por um banho de resfriamento. A reação é esfriada para 20-25°C. O sólido é filtrado e é lavado com DMF (2 x 810 mL). A solução de DMF é diluída com MTBE (5,15 L) e LiCl a 5% (5,15 L). Após agitação em um frasco de fundo redondo de 50 L, as camadas são separadas. A camada aquosa é extraída com MTBE (2,9 L). As camadas de MTBE são combinadas e lavadas com LiCl a 5% (2 x 2,9 L). A camada de MTBE é filtrada por gravidade através de papel filtro e é concentrada usando um frasco de Buchi com o banho de água ajustado a 35°C para proporcionar 892,7 g (95,6 % da teoria, não corrigido) de terc-butil éster de ácido [2-(7-cloro-isoquinolin-5-il-sulfanil)-etil]-carbâmico. Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 339,85$  ( $M+H^+$ ).

#### Preparação 10

15 Terc-butil éster de ácido 2-(7-Cloro-isoquinolina-5-sulfonil)-etil]-carbâmico

O terc-butil éster de ácido [2-(7-Cloro-isoquinolin-5-il-sulfanil)-etil]-carbâmico (700 g; 1,00 equiv; 2,07 mols) é dissolvido em álcool isopropílico (10,53 L) através de rotação sobre um frasco de Buchi com o banho de água ajustado a 50°C. Mequinol (12,29 g; 98,01 mmols; 12,29 g), dihidrato de tungstênio de sódio (31,4 g; 95,20 mmols), a solução de terc-butil éster de ácido [2-(7-Cloro-isoquinolin-5-il-sulfanil)-etil]-carbâmico, álcool isopropílico (2,77 L), água (3,38 L) e ácido acético (123 mL; 2,15 mols; 128,90 g) são carregados a um frasco de 22 L equipado com um condensador, entrada de nitrogênio, agitação superior, funil de adição e termoacoplador. A adição de água faz com que a solução marrom se torne de aparência levemente leitosa. A reação é aquecida para 50°C usando um banho de água quente. Peróxido de hidrogênio (607 mL; 5,94 mols; 673,77 g) é adicionado durante 1 hora. Durante a adição, a temperatura é mantida a 50-55°C através da taxa de adição de peróxido de hidrogênio e através da adição de água fria ou quente ao banho, conforme necessário. A reação ainda é marrom leitosa. A temperatura de reação é de 54°C ao final da adição e é mantida a 53-57°C usando o banho de água. HPLC 10 minutos após a adição indica 24,69 % de

pico a 2,89 min., 65,57 % de produto, 5,03 % de isômero, 4,33 % de bis e 0,18 % de pico a 3,05 min. HPLC 2 horas após a adição indica 0,06 % de sulfóxido, 1,27 % de pico a 3,046 min., 88,10 % de produto, 4,61 % de isômero e 5,79 % de bis. O banho é drenado e substituído por água gelada para esfriar a reação. Quando a temperatura da reação atinge 27°C, o peróxido é resfriado através da adição de solução de bissulfito de sódio a 0,9% (250 mL). Nenhum aumento na temperatura é observado. Tiras de teste de peróxido e papel de iodeto de amido não indicam peróxido restante. Água (5,64 L) é adicionada durante 15-20 minutos. A temperatura aumenta de 18 para 24°C durante a adição. A mistura é agitada em temperatura ambiente durante a noite. A pasta fluida é esfriada em um banho de gelo para <5°C e mantida. HPLC quantitativa do sobrenadante com o tempo indicou que a cristalização estava completa após 1,5 hora a <5°C. O sólido é filtrado e lavado com água (2 x 2 L). O peso do bolo úmido é de 831 g. O sólido é seco *in vacuo* a 50°C. O peso do terc-butil éster de ácido [2-(7-Chloro-isoquinolina-5-sulfonil)-etil]-carbâmico seco é de 531 g (69,31 % da teoria, não corrigido). Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 371,85 (M+H^+)$

#### Preparação 11

Terc-butil éster de ácido (2-{7-[4-(Tetrahydro-piran-2-ilóxi)-fenil]-isoquinolina-5-sulfonil}-etil)-carbâmico

O reator de 60 L é carregado com PEPPSI® (Pyridine-Enhanced Precatalyst Preparation Stabilization and Initiation; 51,0 g; 74,9 mmols), terc-butil éster de ácido [2-(7-Chloro-isoquinolina-5-sulfonil)-etil]-carbâmico (1,383 kg; 3,729 mols), ácido fenil borônico (895 g; 4,03 mols),  $K_2CO_3$  (1,039 kg; 7,518 mols) e etanol (15 L) sob uma purgação de nitrogênio. Inicialmente, 12 L de etanol são adicionados ao reator e os 3 L restantes foram usados para enxaguar nos outros carregamentos. A reação é aquecida até refluxo (78°C). HPLC indica uma reação completa após ½ hora. A reação é esfriada para 59°C usando o circulador Huber®. Água (8,7 L) é adicionada ao reator durante 18 minutos. A temperatura é diminuída de 59°C para 42°C durante a adição de água. A reação é esfriada usando o circulador Huber® de 42°C para 0°C durante 1 hora. A pasta fluida é mantida a 0°C durante 1 hora. O

sólido é filtrado usando uma almofada de polipropileno e lavado com etanol:água a 1:1 (3,7 L; resfriado). O sólido é seco sobre o filtro durante a noite. O sólido é, então, seco *in vacuo* a 60°C durante 22 horas. O peso seco do sólido é de 2,171 kg. O nível de Pd no terc-butil éster de ácido (2-{7-[4-

5 (tetrahydro-piran-2-ilóxi)-fenil]-isoquinolina-5-sulfonil}-etil)-carbâmico bruto é de 2196 mcg/g e o sólido contém 6,9 % de água através de KF. Um frasco de fundo redondo de 50 L é carregado com diclorometano (4 L). O terc-butil éster de ácido (2-{7-[4-(tetrahydro-piran-2-ilóxi)-fenil]-isoquinolina-5-sulfonil}-etil)-carbâmico bruto é carregado ao frasco de 50 L e enxaguado com dicloro-

10 metano (1 L). Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,9 kg) é carregado e enxaguado com diclorometano (0,1 L). Darco G-60® (3,8 kg) é carregado a um frasco de Büchi de 20 L e fluidizado em pasta fluida em diclorometano (12 L). Essa pasta fluida é transferida para o frasco de 50 L e enxaguada com diclorometano (4,9 L). A mistura é agitada durante 2 horas em temperatura ambiente. Um filtro de aço

15 inoxidável de 50 cm é adaptado com uma almofada de polipropileno e carregado com Hyflo Super Cel® (1,7 kg). A almofada de Hyflo Super Cel® é enxaguada com diclorometano (2 L). Os conteúdos do frasco de 50 L são filtrados sobre uma almofada Hyflo Super Cel®. O frasco e a torta de filtro são enxaguados com diclorometano (22 L). O filtrado é carregado para o reator

20 de 60 L através de um filtro com cartucho de 0,45 micron. Os conteúdos do reator são aquecidos e concentrados através de destilação sob ligeiro vácuo (~640 mm de Hg). Aproximadamente 33 L de destilado são coletados durante 2 horas a 35-37°C. Etanol (10 L) é adicionado. O vácuo é ajustado lentamente para 280 mm de Hg enquanto se continua a destilação. Uma vez que

25 o vácuo seja atingido, a temperatura é aumentada para manter a destilação. Uma vez que o volume no reator em ~10 L, etanol (6,5 L) é adicionado em uma taxa tal de modo a manter o volume no reator enquanto se destila o solvente. A destilação é cessada uma vez que todo etanol seja adicionado. O volume final é de ~10 L. A temperatura ao final da destilação é de 56°C. A

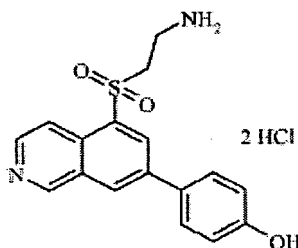
30 pasta fluida que se forma durante a troca de solvente é esfriada para 20°C e mantida durante a noite. A pasta fluida é filtrada. O sólido é lavado com etanol:água a 1:1 (1,8 L). O peso da torta úmida é de 1,878 kg. O sólido é seco

*in vacuo* a 50°C para proporcionar 1,2306 kg (rendimento de 64,36 %) de terc-butil éster de ácido (2-{7-[4-(tetrahidro-piran-2-ilóxi)-fenil]-isoquinolina-5-sulfonil}-etil)-carbâmico. Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 513,62$  (M+H).

### Exemplos

#### 5 Exemplo 1

Sal de dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol



A. terc-butil éster de ácido {2-[7-(4-Metóxi-fenil)-isoquinolin-5-il-sulfanil]-etil}-carbâmico

10 A sal de sódio de 7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-tiol (0,29 g, 1 mmol) em acetona (10 mL), adicionar terc-butil éster de ácido (2-bromo-etil)-carbâmico (0,22 g, 1 mmol) e carbonato de potássio (0,14 g, 1 mmol). Agitar a mistura em temperatura ambiente durante 4 horas, então, carregar sobre uma coluna de sílica-gel e eluir com acetato de etila a 65 % em hexano para proporcionar o composto do título (0,35 g, 86 %). Espectro de massa  
15 (LCMS)  $m/z = 355,2$  (M+H<sup>+</sup>).

B. Terc-butil éster de ácido {2-[7-(4-Metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonil]-etil}-carbâmico

20 A uma solução de terc-butil éster de ácido {2-[7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolin-5-il-sulfanil]-etil}-carbâmico (0,35 g, 0,85 mmol) em ácido acético (8 mL), adicionar água (2 mL). Esfriar a mistura para 0 °C em um banho de gelo. Adicionar uma solução de KMnO<sub>4</sub> (0,27 g, 1,7 mmol) em água (2 mL) gota a gota durante um período de 5 min. Após a adição, agitar a mistura de reação a 0 °C durante 30 min. Adicionar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 % em água) gota a gota até que a cor marrom desapareça. Dividir a mistura entre acetato de etila (50  
25 mL) e bicarbonato de sódio saturado (40 mL). Separar a camada orgânica, secar sobre sulfato de sódio; filtrar e concentrar. Cromatografar o resíduo sobre uma coluna de sílica-gel com acetato de etila a 66 % em hexano para

proporcionar o composto do título (0,245 g) como um sólido branco. Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 433,2$  ( $M+H^+$ ).

C. dicloridrato de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

5 A terc-butil éster de ácido {2-[7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonil]-etil}-carbâmico (0,22 g, 0,51 mmol) em dicloroetano (10 mL), adicionar  $BBr_3$  (1,0 M em diclorometano, 3,0 mL) a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$ . Após a adição, agitar a mistura de reação a  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  durante 2 horas, aquecer lentamente para a temperatura ambiente e agitar em temperatura ambiente durante 2 horas. Adicionar metanol (5 mL) para resfriar  $BBr_3$  em excesso. Evaporar o solvente sob pressão reduzida e purificar o resíduo via HPLC de Fase Reversa (acetonitrila a 0-100 %:água com TFA a 0,01 %) para proporcionar 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol como o sal de TFA (0,18 g). Então, converter 0,12 g do sal de TFA ao sal de dicloridrato através da adição de 2 mL de bicarbonato de sódio saturado aquoso ao sal de TFA e agitar durante a noite de forma a converter o sal de TFA à base livre. Filtrar a base livre. Lavar a base livre, primeiro com água, então, com dietil éter. Secar o sólido. Então, suspender o sólido em MeOH. Adicionar 0,2 mL de HCl aquoso concentrado e agitar durante 1 hora. Concentrar o solvente sob pressão reduzida para proporcionar o sal de dihidrocloro (0,10 g). Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 329,0$  ( $M+H^+$ ).

### Exemplo 2

4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

25 A terc-butil éster de ácido {2-[7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonil]-etil}-carbâmico (25,00 g, 56,49 mmols) em diclorometano (1 L) a  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , adicionar  $BBr_3$  (1,0 M em diclorometano, 200 mL, 200 mmols) durante 40 min com agitação superior vigorosa. Remover o banho de resfriamento e agitar em temperatura ambiente durante a noite. Esfriar para  $0\text{ }^\circ\text{C}$  e adicionar metanol (500 mL) gota a gota durante 1 h. Filtrar a pasta fluida resultante, enxaguar o frasco com diclorometano (100 mL) e lavar os sólidos com o enxágüe. Lavar os sólidos com mais diclorometano (150 mL) e secar sob filtração a vácuo. Fluidizar em pasta os sólidos em metanol (400 mL) com

agitação, então, concentrar sob vácuo até uma pasta fina. Adicionar mais metanol (400 mL) e transformar adicionalmente os sólidos em pasta fluida com agitação. Concentrar a pasta fluida sob vácuo até secagem e secar os sólidos durante a noite sob vácuo. Pulverizar os sólidos até um pó e fluidizar em pasta em metanol (1 L). Adicionar resina Amberlyst® A-21 (75 g) e agitar até que o pó esteja dissolvido. Filtrar a resina, fluidizar em pasta fluida a resina filtrada em metanol (220 mL) e filtrar a resina novamente, combinando os filtrados. Lavar a resina filtrada com metanol (100 mL) e adicionar essa lavagem aos filtrados. Combinar os filtrados com etanol (200 mL) e concentrar a mistura sob vácuo até um volume de cerca de 200 mL para proporcionar uma pasta fluida. Adicionar etanol (400 mL), aquecer a pasta fluida para 50 °C durante cerca de 15 min, então, concentrar sob vácuo até um volume de cerca de 200 mL. Esfriar a pasta fluida para a temperatura ambiente, filtrar e enxaguar a torta de filtro com etanol (2 x 15 mL), então, secar sob vácuo para proporcionar o composto do título (10,22 g, 55 %) como um sólido castanho. Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 329,0$  ( $M+H^+$ ).

### Exemplo 3

4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

Esfriar uma pasta fluida de dicloridrato de 2-[7-(4-metóxi-fenil)-isoquinolina-5-sulfonil]-etilamina (9,5504 g, 22,99 mmols) em  $CH_2Cl_2$  anídrico (400 mL) para ~5 °C com um banho de gelo/ $H_2O$ , então, tratar a pasta fluida esfriada com a adição gota a gota de uma solução a 1,0M de  $BBr_3$  em  $CH_2Cl_2$  (92,00 mL, 92,00 mmols). Quando de adição completa de  $BBr_3$ , remover o banho gelado e deixar a mistura de reação resultante agitar sob  $N_2$  em temperatura ambiente durante a noite. Extinguir a mistura de reação resultante com MeOH, então, concentrar *in vacuo* para proporcionar um resíduo. Dissolver o resíduo resultante em MeOH (200 mL) e concentrar *in vacuo* para proporcionar um resíduo. Repetir o acima 3 vezes, então, fluidizar o resíduo em pasta em  $Et_2O$  (300 mL) e tratar com  $NaHCO_3$  saturado aquoso até que um pH de ~7 seja atingido. Recuperar o sólido resultante através de filtração a vácuo, então, dissolver em uma solução a 3/1 de  $CHCl_3/MeOH$ . Saturar o filtrado com NaCl, então, extrair com uma solução a 3/1 de CH-

Cl<sub>3</sub>/MeOH (2 X 400 mL cada). Secar os orgânicos combinados sobre Mg-SO<sub>4</sub>, filtrar, então, concentrar *in vacuo* para proporcionar um sólido/resíduo. Fluidizar em pasta o sólido/resíduo em uma pequena quantidade de MeOH (20 mL) e hexanos em excesso, então, recuperar o sólido resultante através

5 de filtração a vácuo, lavando com hexanos e secando sob filtração a vácuo para proporcionar (7,60 g) de um sólido amarelo-claro. Transformar o sólido amarelo-claro em pasta fluida (7,60 g) em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> anídrico (400 mL) e esfriar para ~5 °C com um banho de gelo/H<sub>2</sub>O, então, tratar com a adição gota a gota de uma solução de BBr<sub>3</sub> a 1,0M em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70,00 mL, 70,00 mmols).

10 Quando de adição completa do BBr<sub>3</sub>, remover o banho de gelo e deixar a mistura de reação resultante agitar em temperatura ambiente sob N<sub>2</sub> durante 4 horas. Adicionar uma quantidade extra de BBr<sub>3</sub> a 1,0M em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (70,00 mL, 70,00 mmols) gota a gota à mistura de reação, então, deixar a mistura de reação resultante agitar em temperatura ambiente sob N<sub>2</sub> durante a noite.

15 Aquecer a reação a ~40 °C durante ~1 hora, então, tratar com a adição gota a gota de mais BBr<sub>3</sub> a 1,0M em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (23,00 mL, 23,00 mmols). Aquecer a mistura de reação resultante a ~40 °C durante ~2 horas, então, resfriar com MeOH e concentrar *in vacuo* para proporcionar um resíduo. Dissolver o resíduo resultante em MeOH (200 mL) e concentrar *in vacuo* para proporcionar

20 um resíduo amarelo. Repetir o acima 3 vezes. Tratar o resíduo amarelo com NaHCO<sub>3</sub> saturado para ajustar o pH para ~7, então, recuperar o sólido resultante através de filtração a vácuo. Pré-absorver o sólido sobre sílica-gel, então, semi-purificar através de cromatografia em coluna (330 g de sílica-gel ISCO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro a 5 % de NH<sub>4</sub>/MeOH a 2N em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 10 % de

25 NH<sub>4</sub>/MeOH a 2N em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para proporcionar um sólido. Pré-absorver o sólido sobre sílica-gel, então, repurificar através de cromatografia em coluna (330 g de sílica-gel ISCO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro a 5 % de NH<sub>4</sub>/MeOH a 2N em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 10 % de NH<sub>4</sub>/MeOH a 2N em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para proporcionar um sólido. Pré-absorver o sólido sobre sílica-gel, então, repurificar através de cromatografia

30 em coluna (330 g de sílica-gel ISCO, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> puro a 5 % de NH<sub>4</sub>/MeOH a 2N em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 10 % de NH<sub>4</sub>/MeOH a 2N em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> a 15 % de NH<sub>4</sub>/MeOH a 2N em CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) para proporcionar um sólido. Pré-absorver o sólido sobre

sílica-gel, então, repurificar através de cromatografia em coluna (330 g de sílica-gel ISCO, MeOH a 5% em  $\text{CHCl}_3$  a MeOH a 10 % em  $\text{CHCl}_3$  a MeOH a 20 % em  $\text{CHCl}_3$  a MeOH a 30 % em  $\text{CHCl}_3$ ) para proporcionar (6,85 g, rendimento de 90,8 %) do composto do título como um sólido amarelo: MS (ES<sup>+</sup>, m/z): 329,0 (M+1).

#### Exemplo 4

Monocloridrato de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol, estado de hidrato desconhecido

Colocar 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol (171,8 mg) em um frasco junto com 15 mL de EtOH a 95%. Colocar o frasco sobre uma placa quente ajustada a 80 ° C enquanto agita a solução para dissolver o composto. Uma vez que pouca ou nenhuma dissolução ocorre, adicionar um equivalente molar de HCl (0,52 mL de HCl a 1N em água) para dissolver o sólido e resultar em uma solução amarela brilhante. Menos de um minuto após a adição de HCl, formação de sólido começa e aumenta com o tempo. Após ~ 2 horas a 80 °C, remover a amostra do calor e deixar agitar durante a noite em TA. Coletar o sólido usando filtração a vácuo através de um papel filtro. Após secagem ao ar durante a noite, recuperar 107,8 mg do composto do título (rendimento de 63 %). Difração de pó por raios X: ângulo, 2θ (% de intensidade): 11,8 (100,0); 16,6 (52,9); 8,2 (43,4).

#### Exemplo 5

Hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

A. Preparação do material de cultura. A uma pasta fluida de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol (0,2509 g, 0,764 mmols) em etanol (5 mL), adicionar HCl aquoso (1 M, 0,765 mL, 0,765 mmols). Aquecer a mistura resultante até refluxo durante a noite. Esfriar para a temperatura ambiente e filtrar a vácuo a pasta fluida. Enxaguar os sólidos com etanol e secar sob filtração a vácuo para proporcionar 0,1842 g de um sólido amarelo.

B. Hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

A uma pasta fluida de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol (1,75 g, 5,33 mmols) em etanol (35 mL) adicionar HCl aquoso (1 M, 5,33 mL, 5,33 mmols). Aquecer a mistura até refluxo e adicionar água (2,5 mL) para obter uma solução. Esfriar a solução para 60 °C e cultivar com  
 5 cerca de 2 mg do sólido amarelo obtido em A acima para obter uma pasta fluida. Esfriar para a temperatura ambiente e agitar durante a noite. Filtrar a vácuo a pasta fluida e enxaguar a torta de filtro com etanol, então, secar sob filtração a vácuo para proporcionar 1,331 g (67 %) do composto do título como um sólido amarelo. Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 329,0$  ( $M+H^+$ ).  
 10 Karl Fischer: 3,00 %. Difração de pó de raios X: ângulo,  $2\theta$  (% de intensidade): 4,9 (47,3); 14,8 (55,8); 10,2 (45,5).

#### Exemplo 6

Sal de dicloridrato de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

Fluidizar em pasta 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-  
 15 fenol (16,57 g, 50,45 mmols) em metanol (500 mL). Separadamente, preparar uma solução de HCl em metanol através da adição de cloreto de acetila (12,60 mL, 177,05 mmols) a metanol (165 mL). Adicionar a solução de HCl em metanol gota a gota em temperatura ambiente durante 30 min à pasta fluida de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol em metanol. Agi-  
 20 tar durante 30 min, então, adicionar acetato de etila (600 mL) gota a gota durante 1 hora. Agitar durante 30 min, então, filtrar os sólidos e lavar com acetato de etila (2 x 100 mL). Secar os sólidos *in vacuo* a 50 °C, então, ainda secar *in vacuo* em temperatura ambiente com administração lenta de nitrogênio para proporcionar o composto do título (18,3 g, 90 %). Espectro de  
 25 massa (LCMS)  $m/z = 329,0$  ( $M+H^+$ ).

#### Exemplo 7

Sal de dicloridrato de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

O reator de 60 L é carregado com etanol (24 L) e terc-butil éster de ácido (2-{7-[4-(Tetrahydro-piran-2-ilóxi)-fenil]-isoquinolina-5-sulfonil}-etil)-  
 30 carbâmico (2,652 kg; 5,173 mols). O terc-butil éster de ácido (2-{7-[4-(Tetrahydro-piran-2-ilóxi)-fenil]-isoquinolina-5-sulfonil}-etil)-carbâmico é enxaguado com etanol (2,6 L). Solução de ácido clorídrico (31,9 %; 1780 g; 15,6

mols) é diluída com água (1,42 L). Essa solução de HCl é carregada ao reator e enxaguada com água (0,2 L). A reação é aquecida para 70°C. Uma solução amarela se forma em torno de 30°C e uma pasta fluida amarela se forma novamente próximo de 70°C. A reação é mantida a 70°C durante ½ horas e, então, é aquecida até refluxo (78°C). HPLC indica uma reação completa após 1,5 hora em refluxo. Água (14,5 L) é adicionada à reação durante 13 minutos. A temperatura cai para 69°C. A reação é aquecida de volta para refluxo (80°C) e uma solução se forma. A reação é esfriada para 68°C e um sólido começa a se formar. A reação é mantida a 68°C durante ½ horas e, então, esfria para 2°C durante 1,5 hora. A pasta fluida é mantida a 1-2°C durante 1 hora. O sólido é filtrado e lavado com etanol (4,6 L). O peso da torta úmida é de 3,236 kg. O sólido é seco a vácuo a 50°C para proporcionar 2,106 kg (101,4 % da teoria) de sal de dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol. Espectro de massa (LCMS) m/z = 402,31) (M+H).

#### Exemplo 8

Hemihidrato de monoclórídato de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol

As soluções de etanol e hidróxido de sódio usadas para esse exemplo são filtradas através de um filtro com cartucho de 0,22 microns. A água usada é água purificada com controle de endotoxina.

Etanol (8 L) e sal de dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol (841,6 g; 2,097 mols) são carregados a um frasco de 22 L equipado com agitação superior, condensador, entrada de nitrogênio, manta de aquecimento, termoacoplador e funil de adição. O sal de dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol é enxaguado com etanol (3,28 L). A reação é aquecida para 55°C. Solução de hidróxido de sódio (1100 mL; 1,91 N; 2,10 mols) é adicionada à reação durante 7 minutos, tempo durante o qual a temperatura aumenta para 62°C. A reação é aquecida até refluxo (78°C) e mantida durante 1 hora. Água (1,96 L) é adicionada à reação de uma vez. A temperatura diminui para 68°C. A reação é aquecida de volta para refluxo (79°C) e uma solução se forma. Darco G-60@

(438 g) é adicionado à reação. A reação é mantida em refluxo durante 1,25 horas. A pasta fluida quente de Darco G-60® é filtrada através de papel GFF em outro frasco de 22 L. Uma solução amarelo-clara resulta. O frasco original e torta de filtro de Darco G-60® são enxaguados com etanol quente (2,5 L). Durante o enxágüe, um sólido começa a se formar no filtrado. O frasco de 22 L contendo o filtrado e lavado é equipado com agitação superior, entrada de nitrogênio e um termoacoplador. A pasta fluida é agitada e deixada esfriar para a temperatura ambiente. O sólido é filtrado e lavado com etanol (2 L). O peso da torta úmida é de 672 g. O sólido é seco *in vacuo* a 50°C para proporcionar 540 g (rendimento de 68,9 %) de hemihidrato de monoclórato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol. Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 329,3$  ( $M+H^+$ ).

Os compostos exemplificados são inibidores de atividade de Akt. A atividade inibitória desses compostos pode ser demonstrada através dos métodos abaixo.

#### Ensaio de fosforilação de Akt1

O ensaio mede a fosforilação de peptídeo de pseudos-substrato PKC alfa através de Imunoensaio de Polarização por Fluorescência Competitiva (FPIA). O ensaio mede indiretamente a concentração de produto de fosfopeptídeo formado em uma reação através de medição da alteração na intensidade de luz polarizada emitida a partir de um peptídeo rastreador fluorescentemente rotulado quando visualizada a partir de um anticorpo fosfoespecífico pelo produto de fosfopeptídeo. Calibração com uma curva-padrão proporciona resultados quantitativos.

#### Enzima e substrato

Akt1 recombinante humano ativo (comprimento total) purificado a partir de células Sf9 de inseto é obtida da Upstate Biotechnology, Inc. Substrato Peptídico (M.W. 1561) é comprado.

#### Soluções-padrão de ensaio

Solução (A): DMSO a 20 % (sulfóxido de dimetila) ou Composto em DMSO a 20 % ou EDTA a 500 mM; Solução (B): Mistura de Tampão de Ensaio: Substrato Peptídico a 75  $\mu$ M,  $MgCl_2$  a 38 mM, HEPES a 70 mM, pH

de 7,4, Triton X-100® a 0,01 % e ATP a 50  $\mu$ M (trifosfato de adenosina); Solução (C): Mistura de Akt Quinase: HEPES a 70 mM, pH de 7,4, DTT a 1 mM (ditiotreitól), Triton-X-100® a 0,01 % e enzima Akt1.

#### Procedimento para FPIA

5                   Cinco  $\mu$ L de Solução (A) são primeiro misturados com 10  $\mu$ L de Solução (B). A reação enzimática é iniciada através da adição de 10  $\mu$ L de Solução (C) à mistura. (concentração final ou quantidade em uma mistura de reação de 25  $\mu$ L: DMSO a 4 % (mínimo de cavidades inibidas) ou várias concentrações de composto em DMSO a 4 % ou EDTA a 100 mM (máximo de cavidades inibidas); Substrato Peptídico a 30  $\mu$ M;  $MgCl_2$  a 15 mM; HEPES a 70 mM, pH de 7,4; ATP a 20  $\mu$ M; DTT a 0,4 mM; Triton X-100® a 0,01 %). As reações são realizadas em lâminas de microtitulação com 96 cavidades com fundo plano em meia-área preta.

15                   Após 60 min em temperatura ambiente, a reação é terminada através da adição de 25  $\mu$ L de Mistura de Extinção/Deteção contendo EDTA a 260 mM, Traçador de Fluoresceína a 3,4 nM e Anticorpo Antifosfosserina a 7,5 nM. As lâminas são incubadas no escuro em temperatura ambiente durante mais de 3 horas e, então, polarização de fluorescência (a  $\lambda_{ex}$  = 485 nm,  $\lambda_{ex}$  = 530 nm) é lida usando um leitor para lâmina Tecan Ultra. A  
20                   concentração de produto fosforilado por cavidade é calculada a partir de unidades de milipolarização (mP) usando uma série de diluições de competidor peptídico preparada como uma curva-padrão. Compostos exemplificados da invenção inibem a fosforilação de Akt com uma  $IC_{50}$  de 1  $\mu$ M ou menos. O  
25                   composto do Exemplo 1 inibe a fosforilação de Akt1 nesse ensaio com uma  $IC_{50}$  de 45 +/- 17 nM (n = 3).

#### ELISA -baseada em célula (cELISA) para a deteção de Fosfo-GSK3b (pGSK3b): um alvo de Akt em células

30                   Células U87MG em crescimento exponencial derivadas de um glioblastoma humano são cultivadas em lâminas com 96 cavidades e incubadas durante a noite a 37°C com 5 % de  $CO_2$ . Dez concentrações do composto do Exemplo 1 são preparadas a partir de um estoque a 4 mM (em DMSO a 100 %) através de diluições seriais a 1:2 no meio de cultura. Um

volume igual de cada uma das diluições seriais é adicionado diretamente às células. O tratamento é cessado 2 horas depois. Ao final do tratamento, o meio de cultura é removido e as células são lavadas uma vez com solução salina tamponada com fosfato gelada (PBS). As células são fixadas em  
5 PREFER de acordo com o procedimento do vendedor, seguido por enxágües em PBS/SDS a 0,1 % e PBS/Triton X-100® a 0,1 %, então, incubação durante a noite em tampão SEA Block Blocking. A etapa de bloqueio é seguida por uma incubação durante a noite das células com um anticorpo de coelho contra pGSK3b/Ser9, seguido por uma IgG anticoelho de cabra. A  
10 pGSK3b é detectada através de SuperSignal ELISA Femto seguindo o procedimento do vendedor. O composto do Exemplo 1 inibe a pGSK3b nesse ensaio com uma IC<sub>50</sub> de 2,04 +/- 0,68 (n = 8) µM.

#### Estudos de inibição de alvo *in vivo*

Inibição de alvo *in vivo* através de uma única injeção IV:

15 Células U87MG em crescimento exponencial de um glioblastoma humano são implantadas subcutaneamente no flanco traseiro de camundongos nus. Quando os tumores atingem um tamanho de 200-250 mm<sup>3</sup>, compostos são administrados aos animais através de uma única injeção IV em um estudo de dose-resposta ou em um estudo de curso de tempo. Ao  
20 final de cada tratamento, os animais são asfixiados com CO<sub>2</sub>. Os tumores são coletados através de excisão cirúrgica, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80 °C até análise. Soros são preparados a partir do sangue coletado do coração através de punção cardíaca e armazenados a -80 °C até análise.

25 Análise de amostra:

O inibidor de Akt é extraído do soro com acetonitrilo/metanol e analisado ao lado de um padrão interno através de LC/MS/MS. Os tumores são homogeneizados em 2 volumes de um tampão de lise contendo Tris a 25 mM (pH 7,5), Roche, inibidores completos de protease e vanadato a 1  
30 mM com um homogeneizador Powergen 125, então, seqüencialmente passados através de uma agulha de 1,0236 x 10<sup>-3</sup>m (18 gauge) e uma agulha de 0,5715 x 10<sup>-3</sup>m (23 gauge). Extratos citoplásmicos solúveis são coletados

da fração de sobrenadante após os lisatos serem centrifugados durante 30 minutos a 20.000 x g. As concentrações de proteína nos extratos citoplásmicos são determinadas com um kit BCA. Fosfo-GSK3b (pGSK3b) nos extratos solúveis é analisada com o kit ELISA.

5                    Para glioblastoma nesse ensaio, o composto do Exemplo 1 inibe a pGSK3b em 76 % em 1 hora usando uma única injeção IV de 25 mg/kg.

Estudos de inibição de crescimento de tumor *in vivo*

                    Células U87MG em crescimento exponencial derivadas de um glioblastoma humano ou células H1155 derivadas de câncer de pulmão de  
10 células não-pequenas são implantadas subcutaneamente no flanco traseiro de camundongos nus. Três dias após os implantes das células tumorígenas, a microcirurgia é realizada para inserir um cateter com cânula para infusão contínua via a veia jugular. Exemplo 1, formulado em D5W (dextrose a 5 % em água) em várias concentrações é, então, infundido aos camundongos no  
15 dia seguinte a 40 µL/hora durante 4 dias. Os tumores são medidos duas vezes por semana até que o estudo tenha terminado, usualmente em 24 dias após os implantes iniciais. Inibição de crescimento de tumor é calculada dividindo-se o volume médio do tumor do grupo tratado por aquele do grupo tratado com veículo.

20                    Para glioblastoma, o composto do Exemplo 1 inibe o crescimento de tumor em 50 % usando infusão contínua de 27 mg/kg/dia quando medido no final do ensaio.

                    Para câncer de pulmão de células não-pequenas, o composto do Exemplo 1 inibe o crescimento de tumor em 63 % usando infusão contínua  
25 de 24 mg/kg/dia quando medido ao final do ensaio.

Estudos de composição farmacêutica

                    Uma composição farmacêutica de hemihidrato de monoclórato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol compreende um açúcar de não-redução e um agente para ajuste de pH. Estudos de solubilidade  
30 mostram que o manitol não parece ter um impacto sobre a solubilidade do hemihidrato de monoclórato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol. Contudo, a solubilidade do hemihidrato é dependente de pH e é >

19 mg/mL em um pH  $\leq$  3,91. Também, a taxa na qual a precipitação ocorre é dependente de pH.

Tabela 1: Efeito do pH inicial da solução sobre a taxa de precipitação (ppt). Todas as soluções são preparadas inicialmente a aproximadamente 15 mg de hemihidrato de monoclórato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol/mL e armazenadas em temperatura ambiente

Meio	pH (inicial)	Precipitação (ppt)
HCl a 0,05 N/manitol a 3 %	1,68	sem ppt. até 96 horas
HCl a 0,01 N/manitol a 3 %	3,19	sem ppt. até 96 horas
HCl a 0,005 N/manitol a 3 %	3,58	ppt. após 48 horas
HCl a 0,0025 N/manitol a 3 %	3,91	ppt. após 36 horas
HCl a 0,001 N/manitol a 3 %	4,20	ppt. após 24 horas

Análise por LC/MS do precipitado redissolvido indica que ele é uma molécula "semelhante a dímero" (Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 640,2$  ( $M+H^+$ )) que se forma a partir de duas moléculas de 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol (Espectro de massa (LCMS)  $m/z = 329,1$  ( $M+H^+$ ) para 4-[5-(2-Amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol) após a perda de amônia. Adicionalmente, a precipitação não parece ser em virtude de uma alteração para uma forma em estado sólido menos solúvel.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto, o qual é 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo ou um hidrato do composto ou o sal do mesmo.
- 5           2. Composto de acordo com a reivindicação 1, o qual é dicloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.
3. Composto de acordo com a reivindicação 1, o qual é hemihidrato de monocloridrato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol.
- 10           4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para uso como um medicamento.
5. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma, neuroblastoma, melanoma ou neoplasmas da próstata, mama, ovários, estômago primário, tipo intestinal, endométrio, tireóide, pâncreas, pulmão ou bexiga.
- 15           6. Uso de um composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma ou neoplasmas da próstata, mama ou ovários.
- 20           7. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas ou glioblastoma.
- 25           8. Uso do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, para a fabricação de um medicamento para o tratamento de hepatite C, rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B ou citomegalovírus humano (HCMV).
- 30           9. Método de tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma, neuroblastoma, melanoma ou neoplasmas da próstata, mama, ovários, estômago primário, tipo intestinal, endométrio, tireóide, pâncreas, pulmão ou bexiga em um paciente em necessi

dade dos mesmos compreendendo uma administração em quantidade eficaz do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

5 10. Método de tratamento de mieloma múltiplo, câncer de pulmão de células não-pequenas, glioblastoma ou neoplasmas da próstata, mama ou ovários em um paciente em necessidade dos mesmos compreendendo administração de uma quantidade eficaz do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

10 11. Método de tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas ou glioblastoma em um paciente em necessidade dos mesmos compreendendo administração de uma quantidade eficaz do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3.

15 12. Método de tratamento de hepatite C, rubéola, vírus da imunodeficiência humana (HIV), hepatite B ou citomegalovírus humano (HCMV) em um paciente em necessidade dos mesmos compreendendo administração de uma quantidade eficaz do composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3..

20 13. Composição farmacêutica compreendendo o composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável.

20 14. Composição farmacêutica liofilizada compreendendo o composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável em que o pH da referida composição, quando diluída com diluente aquoso, é menor do que 4,2 e maior do que 2,0.

25 15. Composição farmacêutica liofilizada de acordo com a reivindicação 14, em que o pH é menor do que 3,2 e maior do que 2,0.

16. Composição farmacêutica liofilizada de acordo com a reivindicação 15, em que o pH é menor do que 2,8 e maior do que 2,0.

30 17. Composição farmacêutica compreendendo o composto como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 3, e um veículo, diluente ou excipiente farmacêuticamente aceitável em solução, em que o pH da referida composição é menor do que 4,2 e maior do que 2,0.

18. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 17, em que o pH da referida composição é menor do que 3,2 e maior do que 2,0.

19. Composição farmacêutica de acordo com a reivindicação 18, em que o pH da referida composição é menor do que 2,8 e maior do que 2,0.

5 20. Hemihidrato de monoclórato de 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol na forma cristalina tendo um padrão de difração de pó por raios X com picos de intensidade a  $2\theta = 4,9, 14,8$  e  $10,2$ .

**RESUMO**

Patente de Invenção: "INIBIDORES DE AKT (PROTEÍNA QUÍNASE B)".

A presente invenção refere-se a 4-[5-(2-amino-etano-sulfonil)-isoquinolin-7-il]-fenol ou a um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo ou a um hidrato do composto ou ao sal do mesmo como inibidores de AKT que são agentes antineoplásicos e/ou agentes antivirais, bem como composições compreendendo esses compostos e métodos de uso desses compostos.