



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

(21) **PI0617863-4 A2**

(22) Data de Depósito: 20/10/2006
(43) Data da Publicação: 09/08/2011
(RPI 2118)



(51) Int.Cl.:
C07D 487/02 2006.01
A61K 31/519 2006.01
A61P 29/00 2006.01
A61P 35/00 2006.01

(54) Título: **COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES COMO INIBIDORES DA PROTEÍNA QUINASE**

(30) Prioridade Unionista: 28/10/2005 US 60/731.179

(73) Titular(es): IRM LLC, The Scripps Research Institute

(72) Inventor(es): Advait Nagle, Nathanael S. Gray

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

(86) Pedido Internacional: PCT US2006041229 de 20/10/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/053343 de 10/05/2007

(57) Resumo: COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES COMO INIBIDORES DA PROTEÍNA QUINASE. A presente invenção refere-se a uma nova classe de compostos, composições farmacêuticas que compreendem tais compostos e métodos para se utilizar tais compostos para tratar ou prevenir doenças ou distúrbios associados com a atividade de quinase anormal ou desregulada, particularmente doenças ou distúrbios que envolvem ativação anormal das Abl, Bcr-Abl, Aurora- A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Syk, Tie2 e TrkB quinases.



Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES COMO INIBIDORES DA PROTEÍNA QUINASE**".
REFERÊNCIAS CRUZADAS AOS PEDIDOS CORRELATOS

Este pedido reivindica o benefício de prioridade sob 35 U.S.C. §
5 119(e) de Pedido de Patente to Provisório No. U.S. 60/731.179 depositado em 28 de outubro de 2005. A descrição do pedido de prioridade está incorporada no presente documento a título de referência em sua totalidade e para todos os propósitos.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

10 Campo da Invenção

A presente invenção refere-se a uma nova classe de compostos, composições farmacêuticas que compreendem tais compostos e métodos para utilizar tais compostos para tratar ou prevenir doenças ou distúrbios associados com atividade de quinase anormal ou desregulada, particularmente doenças e distúrbios que envolvem ativação anormal das Abl, Bcr-Abl, Aurora-A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Sik, Tie2 e TrkB quinases.

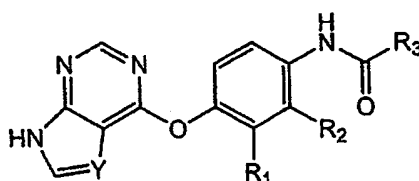
Antecedentes

20 As proteínas quinases representam uma extensa família de proteínas, que exercem uma função fundamental na regulação de uma variedade de processos celulares e manutenção de controle sobre a função celular. Uma lista parcial, não-limitativa destas quinases inclui: as tirosina quinases receptoras, tais como, quinase receptora de fator de crescimento derivado de plaqueta (PDGF-R), o receptor de fator de crescimento de nervos, trkB, Met, e o receptor de fator de crescimento de fibroblasto, FGFR3; tirosina quinases não-receptoras, tais como, Abl e a quinase de fusão BCR-Abl, Lck, Csk, Fes, Bmx e c-src; e serina/treonina quinases, tais como, b-RAF, c-RAF, sgk, MAP quinases (por exemplo, MKK4, MKK6, etc) e SAPK2 α , SAPK2 β e
25 SAPK3. A atividade anormal da quinase foi observada em muitos estados de doença, inclusive, distúrbios proliferativos malignos bem como doenças que resultam de ativação inapropriada dos sistemas imune e nervoso.
30

Os novos compostos desta invenção inibem a atividade de uma ou mais proteínas quinases e espera-se, portanto, que sejam úteis no tratamento de doenças associadas com quinase.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

5 Em um aspecto, a presente invenção proporciona compostos da Fórmula I:



onde:

Y é selecionado entre N e CH;

R₁ é selecionado entre hidrogênio e C₁₋₆alquila;

10 R₂ é selecionado entre hidrogênio e C₁₋₆alquila; ou R₁ e R₂, juntamente com o anel fenila ao qual R₁ e R₂ estão ligados formam C₁₋₆arila ou C₅₋₁₀heteroarila;

R₃ é selecionado entre NR₄R₅ e XiR₅; onde X₁ é selecionado entre uma ligação e C₁₋₄alquilenos; R₄ é selecionado entre hidrogênio e C₁₋₆alquila; R₅ é selecionado entre C₆₋₁₀arila, opcionalmente substituído por 1 a 3 radicais independentemente selecionados entre halo-C₁₋₆alquila substituída, C₁₋₆-alcóxi, C₅₋₁₀heteroaril-C₀₋₄alquila e C₃₋₈heterocicloalquil-C₀₋₄alquila; onde os ditos substituintes de heteroarila e heterocicloalquila de R₅ são opcionalmente substituídos por C₁₋₆-alquila; e os derivados de N-óxido, derivados de pró-fármaco, derivados protegidos, isômeros individuais e mistura de isômeros destes; e os sais e solvatos farmacologicamente aceitáveis (por exemplo, hidratos) de tais compostos.

25 Em um segundo aspecto, a presente invenção proporciona uma composição farmacêutica que contém um composto da Fórmula I ou um derivado de N-óxido, isômeros individuais e mistura de isômeros deste; ou um sal farmacologicamente aceitável deste, em mistura com um ou mais excipientes adequados.

Em um terceiro aspecto, a presente invenção proporciona um método para tratar uma doença em um animal onde a inibição de atividade

de quinase, particularmente atividade de Abl, Bcr-Abl, Aurora-A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, RskI, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Sik, Tie2 e/ou TrkB, pode prevenir, inibir ou me-

5 lhorar a patologia e/ou sintomatologia das doenças, tal método compreende administrar no animal uma quantidade terapêuticamente eficaz de um composto da Fórmula I ou um derivado de N-óxido, isômeros individuais e mistura de isômeros deste, ou um sal farmacologicamente aceitável deste.

Em um quarto aspecto, a presente invenção proporciona o uso

10 de um composto da Fórmula I na fabricação de um medicamento para tratar uma doença em um animal em que a atividade de quinase, particularmente atividade de Abl, Bcr-Abl, Aurora-A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, RskI, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Sik,

15 Tie2 e/ou, contribui para a patologia e/ou sintomatologia da doença.

Em um quinto aspecto, a presente invenção proporciona um processo para preparar compostos da Fórmula I e os derivados de N-óxido, derivados de pró-fármaco, derivados protegidos, isômeros individuais e mistura de isômeros deste, e os sais farmacologicamente aceitáveis deste.

20 DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Definições

"Alquila" como um grupo e como um elemento estrutural de outros grupos, por exemplo, alquila e alcóxi halossubstituída, podem ser tanto de cadeia linear como ramificada. C₁₋₄-alcóxi inclui, metóxi, etóxi, e similares.

25 Alquila halossubstituída inclui trifluorometila, pentafluoroetila e similares.

"Arla" significa um conjunto de anel aromático monocíclico ou bicíclico fundido que contém seis a dez átomos de carbono no anel. Por exemplo, arila pode ser fenila ou naftila, de preferência, fenila. "Arleno" significa um radical divalente derivado de um grupo arila.

30 "Heteroarila" é conforme definido por arila acima onde um ou mais elementos de anel consistem em um heteroátomo. Por exemplo, heteroarila inclui piridila, indolila, indazolila, quinoxalinila, quinolinila, benzofurani-

la, benzopirânica, benzotiopirânica, benzo[1,3]dioxol, imidazolila, benzoimidazolila, pirimidinila, furanila, oxazolila, isoxazolila, triazolila, tetrazolila, pirazolila, tienila, etc.

"Cicloalquila" significa uma montagem de anel, monocíclico, bi-
 5 cíclico fundido ou policíclico de ponte saturado ou parcialmente insaturado que contém o número de átomos no anel indicado. Por exemplo, C₃₋₁₀-cicloalquila inclui ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, cicloexila, etc.

"Heterocicloalquila" significa cicloalquila, conforme definido neste
 pedido, ficando estabelecido que um ou mais carbonos no anel indicados,
 10 são substituídos por uma parte selecionada entre -O-, -N=, -NR-, -C(O)-, -S-,
 -S(O) - ou -S(O)₂-, onde R é hidrogênio, C₁₋₄alquila ou um grupo de proteção de nitrogênio. Por exemplo, C₃₋₈-heterocicloalquila, como usado neste
 pedido, que descreve compostos da invenção, inclui morfolino, pirrolidinila,
 pirrolidinil-2-ona, piperazinila, piperidinila, piperidinilona, 1,4-dioxa-8-azaspiro
 15 [4.5]dec-8-ila, etc.

"Halogênio" (ou halo) representa, de preferência, cloro ou flúor-
 também pode ser bromo ou iodo.

"Painel de Quinase" é uma lista de quinases que compreendem
 Abl(humano), Abl(T3151), JAK2, JAK3, ALK, JNK1 α 1, ALK4, KDR, Aurora-A,
 20 Lck, Blk, MAPK1, Bmx, MAPKAP- K2, BRK, MEK1, CaMKII(rato), Met,
 CDK1/ciclinaB, p70S6K, CHK2, PAK2, CK1, PDGFR α , CK2, PDK1, c-kit,
 Pim-2, c-RAF, PKA(h), CSK, PKB α , cSrc, PKC α , DYRK2, Plk3, EGFR,
 ROCK-I, Fes, Ron, FGFR3, Ros, Flt3, SAPK2 α , Fms, SGK, Fin, SIK,
 GSK3 β , Syk, IGF-1R, Tie-2, IKK β , TrkB, IR, WNK3, IRAK4, ZAP-70, ITK,
 25 AMPK(rato), LIMK1, Rsk2, Ax1, LKB1, SAPK2 β , BrSK2, Lyn (h), SAPK3,
 BTK, MAPKAP-K3, SAPK4, CaMKIV, MARK1, Snk, CDK2/ciclinaA, MINK,
 SRPK1, CDK3/ciclinaE, MKK4(m), TAK', CDK5/p25, MKK6(h), TBK',
 CDK6/ciclinaD3, MLCK, TrkA, CDK7/ciclinaH/MAT1, MRCK β , TSSK1, CHK1,
 MSK1, Yes, CK1d, MST2, ZIPK, c-Kit (D816V), MuSK, DAPK2, NEK2, D-
 30 DR2, NEK6, DMPK, PAK4, DRAK1, PAR-1B α , EfA1, PDGFR β , EfA2, Pim-1,
 EfA5, PKB β , EfB2, PKC β 1, EfB4, PKC δ , FGFR1, PKC η , FGFR2, PKC θ , FG-
 FR4, PKD2, Fgr, PKG1 β , Flt1, PRK2, Hck, PYK2, HIPK2, Ret, IKK α , RIPK2,

IRR, ROCK-II(humano), JNK2 α 2, Rse, JNK3, Rsk1(h), PI3 K γ , PI3 K δ e PI3-K β . Os compostos da invenção são verificados contra o painel de quinase (tipo selvagem e/ou mutação desta) e inibem a atividade de pelo menos um dos ditos elementos do painel.

5 "Formas mutantes de BCR-Abl" significa alterações únicas ou múltiplas da seqüência de aminoácido tipo selvagem. As mutações em BCR-ABL atuam ao romper os pontos de contato principais entre a proteína e o inibidor (por exemplo, Gleevec, e similares), mais frequentemente, ao induzir uma transição do estado inativo para o estado ativo, ou seja, a uma configuração na qual BCR-ABL e Gleevec é incapaz de se ligar. A partir das análises de amostras clínicas, o repertório de mutações encontrado em associação com o fenótipo resistente foi aumentando lentamente, porém de forma inexorável ao longo do tempo. As mutações pareciam se aglomerar em quatro regiões principais. Um grupo de mutações (G250E, Q252R, Y253F/H, 10 E255K/V) inclui aminoácidos que formam a alça de ligação de fosfato para ATP (também conhecida como alça-P). Um segundo grupo (V289A, F311LA, T315I, F317L) pode ser encontrado no sítio de ligação Gleevec e interage diretamente com o inibidor através de ligações de hidrogênio ou interações de Van der Waals'. O terceiro grupo de mutações (M351T, E355G) se agrupa em estreita proximidade com o domínio catalítico. O quarto grupo de mutações (H396R/P) está localizado na alça de ativação, cuja conformação é a troca molecular que controla a ativação/inativação de quinase. As mutações de ponto BCR-ABL associadas com a resistência de Gleevec detectadas em 15 pacientes CML e ALL incluem: M224V, L248V, G250E, G250R, Q252R, Q252H, Y253H, Y253F, E255K, E255V, D276G, T277A, V289A, F311L, T315I, T315N, F317L, M343T, M315T, E355G, F359V, F359A, V379I, F382L, L387M, L387F, H396P, H396R, A397P, S417Y, E459K, e F486S (Posições de aminoácido, indicadas pelo código de uma única letra, são aquelas para a seqüência GenBank, número de acesso AAB60394, e correspondem a ABL tipo 1a; Martinelli et al., Haematologica/Te Hematology Journal, 2005, April; 90-4). A menos que estabelecido em contrário nesta invenção, Bcr-Abl se refere a formas tipo selvagem e mutante da enzima. 20 25 30

"Tratar", "tratando" e "tratamento" se referem a um método para aliviar ou suavizar a doença e/ou seus sintomas acompanhantes.

Descrição das Modalidades Preferidas

A presente invenção proporciona compostos, composições e métodos para o tratamento de doença relacionada com quinase, particularmente, doenças relacionadas a quinase Abl, Bcr-Abl, Aurora-A, Ax1, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, RskI, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Syk, Tie2 e TrkB. Por exemplo, leucemia e outros distúrbios proliferativos relacionados a BCR-Abl podem ser tratados através da inibição de formas tipo selvagem e mutante de Bcr-Abl.

Em uma modalidade, com referência a compostos da Fórmula I, cada R₁ e R₂ é hidrogênio.

Em outra modalidade, R₁ e R₂, juntamente com o anel fenila ao qual R₁ e R₂ estão ligados formam quinolinila ou naftalenila.

Em outra modalidade, R₃ é selecionado entre NHR₅ e X₁R₅; onde X₁ é selecionado entre uma ligação e metileno; R₅ é selecionado entre fenila opcionalmente substituída por 1 a 3 radicais independentemente selecionados entre trifluorometila, metóxi, imidazolila e piperazinil-metila; onde os ditos substituintes de imidazolila ou piperazinila de R₅ são opcionalmente substituídos por metila e etila.

Os compostos preferidos da invenção são selecionados entre: 1-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-3-(3-trifluorometil-fenil)-uréia; 1-[4-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-3-trifluorometil-fenil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[3-(4-Metil-imidazol-1-il)-5-trifluorometil-fenil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-(3,5-Dimetóxi-fenil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[4-(9H-Purin-6-ilóxi)-fenil]-3-(3-trifluorometil-fenil)-uréia; 1-[3-(4-Metil-imidazol-1-il)-5-trifluorometil-fenil]-3-[4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[4-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-3-trifluorometil-fenil]-3-[4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[5-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-quinolin-8-il]-3-(3-trifluorometil-fenil)-uréia; N-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-2-(3-trifluorometil-fenil)-acetamida; 2-[3-(4-Metil-imidazol-1-il)-5-trifluo-

rometil-fenil]-N-[4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-acetamida; N-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d] pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-3-trifluorometil-benzamida; 3-(4-Metil-imidazol-1-il)-N-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-5-trifluorometil-benzamida; N-[4-(9H-Purin-6-ilóxi)-fenil]-3-trifluorometil-benzamida; 4-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-N-
 5 [4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-3-trifluorometil-benzamida; e N-[5-(9H-Purin-6-ilóxi)-quinolin-8-il]-3-trifluorometil-benzamida.

Os compostos preferidos adicionais da invenção estão detalhados nos Exemplos e na Tabela I, *infra*.

Farmacologia e Utilidade

10 Os compostos da invenção modulam a atividade de quinases e, como tais, são úteis para tratar doenças ou distúrbios onde as quinases contribuem para a patologia e/ou sintomatologia da doença. Exemplos de quinases que são inibidas pelos compostos e composições descritos aqui e
 15 contra os mesmos, os métodos descritos no presente documento são úteis incluem, porém sem caráter limitativo, Abl, Bcr-Abl (formas tipo selvagem e mutante), Aurora-A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Syk, Tie2 e TrkB.

20 A tirosina quinase Abelson (ou seja, Abl, c-Abl) está envolvida na regulação do ciclo celular, na resposta celular para estresse genotóxico, e na transmissão de informações sobre o ambiente celular através da sinalização de integrina. Geralmente, parece que a proteína Abl executa uma função complexa como um módulo celular que integra sinais de diversas fontes extracelulares e intracelulares e que influencia nas decisões com relação ao
 25 ciclo e apoptose celular. A tirosina quinase Abelson inclui derivados de subtipos, tais como, BCR-Abl de fusão quimérica (oncoproteína) com atividade de tirosina quinase desregulada ou v-Abl. BCR-Abl é fundamental na patogênese de 95% de leucemia mielógena crônica (CML) e 10% de leucemia linfocítica aguda. STI-571 (Gleevec) é um inibidor da tirosina quinase BCR-Abl oncogênica e é usado para o tratamento de leucemia mielóide crônica
 30 (CML). Entretanto, alguns pacientes no estágio de crise blástica de CML são resistentes a STI-571 devido às mutações na quinase BCR-Abl. Mais de 22

mutações foram relatadas, até o momento, as mais comuns são G250E, E255V, T315I, F317L e M351T.

Os compostos da presente invenção inibem a quinase abl, especialmente quinase v-abl. Os compostos da presente invenção também inibem a quinase BCR-Abl tipo selvagem e mutações de quinase BCR-Abl e são, desta maneira, adequados para o tratamento de doenças cancerígenas positivas e tumorais Bcr-abl, tais como, leucemias (especialmente leucemia mielóide crônica e leucemia linfoblástica aguda, onde especialmente os mecanismos apoptóticos de ação são encontrados), e também mostra efeitos sobre o subgrupo de células-tronco leucêmicas bem como potencial para a purificação destas células *in vitro* após a remoção de ditas células (por exemplo, remoção da medula óssea) e reimplante das células uma vez que estas se livraram das células cancerígenas (por exemplo, reimplante de células purificadas da medula óssea).

A malária é causada por parasitas protozoários do gênero Plasmodio. Quatro espécies de Plasmodio podem ocasionar a doença em suas várias formas: Plasmodium falciparum; Plasmodium vivax; Plasmodium ovale; e Plasmodium malariae. P. falciparum, o mais freqüente e perigoso, pode resultar em malária cerebral fatal se não receber nenhum tratamento. A atividade da proteína tirosina quinase é distribuída em todas as etapas de maturação de parasita P. falciparum e os inibidores de quinase da presente invenção podem ser usados para tratar doenças relacionadas com Plasmodio. Os inibidores da tirosina quinase da presente invenção, em particular inibidores de c-kit podem ser uma rota para tratar doenças relacionadas com Plasmodio através da inibição do crescimento de Plasmodium falciparum. A análise *in vitro*, *infra*, é usada como um meio para determinar a atividade de compostos da invenção contra uma variedade de cepas de parasita malárico.

A via de sinalização Ras-Raf-MEK-ERK medeia a resposta celular a sinais de crescimento. Ras é modificado para uma forma oncogênica em ~15% de câncer humano. A família Raf pertence à proteína serina/treonina quinase e esta inclui três elementos, A-Raf, B-Raf e c-Raf (ou

Raf-1). O foco sobre Raf como um alvo do fármaco se centralizou na relação de Raf como um efetor a jusante de Ras. Entretanto, dados recentes sugerem que B-Raf pode exercer uma função importante na formação de certos tumores sem necessidade de um alelo Ras ativado (Nature 417, 949 - 954
5 (01 Jul. 2002). Em particular, as mutações de B-Raf foram detectadas em uma grande porcentagem de melanomas malignos.

Os tratamentos médicos existentes para melanoma são limitados em sua eficácia, especialmente melanomas em fase final. Os compostos da presente invenção também inibem os processos celulares que envolvem
10 b-Raf quinase, fornecendo uma nova oportunidade terapêutica para tratamento de cânceres humanos, especialmente para melanoma.

Os compostos da presente invenção também inibem os processos celulares que envolvem c-Raf quinase. c-Raf é ativada pelo oncogene ras, que é modificado em um grande número de cânceres humanos. Portanto, a inibição da atividade de quinase de c-Raf pode fornecer uma forma de
15 impedir o crescimento de tumor mediado por ras [Campbell, S. L., Oncogene, 17, 1395 (1998)].

PDGF (Fator de Crescimento derivado de plaqueta) é um fator de crescimento muito comumente ocorrente, que exerce uma função importante tanto em crescimento normal como também em proliferação celular
20 patológica, tal como observado em carcinogênese e em doenças das células do músculo liso de vasos sanguíneos, por exemplo, em aterosclerose e trombose. Os compostos da invenção podem inibir a atividade do receptor PDGF (PDGFR) e são, portanto, adequados para o tratamento de doenças
25 tumorais, tais como, gliomas, sarcomas, tumores da próstata, e tumores do cólon, mama e ovário.

Os compostos da presente invenção podem ser usados não só como uma substância inibidora de tumor, por exemplo, em câncer de pulmão de pequenas células, como também como um agente para tratar distúrbios proliferativos malignos, tais como, aterosclerose, trombose, psoríase,
30 escleroderma e fibrose, bem como para a proteção de células-tronco, por exemplo, para combater o efeito hemotóxico de agentes quimioterapêuticos,

tais como, 5-fluoruracila, e em asma. Os compostos da invenção podem ser especialmente usados para o tratamento de doenças, que respondem a uma inibição da quinase receptora de PDGF.

Os compostos da presente invenção mostram efeitos úteis no tratamento de distúrbios que surgem como um resultado de transplante, por exemplo, transplante alogênico, especialmente rejeição de tecido, tal como, especialmente bronquiolite obliterante (OB), ou sejam uma rejeição crônica de transplantes pulmonares alogênicos. Ao contrário de pacientes sem OB, aqueles com OB geralmente mostram uma concentração de PDGF elevada em fluidos de lavagem broncoalveolar.

Os compostos da presente invenção também são eficazes em doenças associadas com a migração e proliferação de célula do músculo liso vascular (onde PDGF e PDGF-R geralmente exercem uma função), tal como restenose e aterosclerose. Estes efeitos e as conseqüências destes para a proliferação ou migração de células do músculo liso vascular *in vitro* e *in vivo* podem ser demonstrados através da administração dos compostos da presente invenção, e também através da investigação de seus efeitos sobre o espessamento da íntima vascular após a lesão mecânica *in vivo*.

A família trk de receptores de neurotrofina (trkA, trkB, trkC) promove a sobrevivência, crescimento e diferenciação dos tecidos neuronais e não-neuronais. A proteína TrkB é expressa em células do tipo neuroendócrino no intestino delgado e cólon, nas células alfa do pâncreas, nos monócitos e macrófagos dos linfonodos e do baço, e nas camadas granulares da epiderme (Shibaiama and Koizumi, 1996). A expressão da proteína TrkB foi associada com um progresso desfavorável de tumores de Wilms e de neuroblastomas. TkrB é, além disso, expressa em células cancerígenas da próstata, porém não em células normais. A via de sinalização a jusante dos receptores trk envolve a cascata de ativação de MAPK através de She, genes Ras ativados, ERK-1 e ERK-2, e a via de transdução PLC-gammal (Sugimoto et al., 2001).

A quinase, c-Src transmite sinais oncogênicos de muitos receptores. Por exemplo, a superexpressão de EGFR ou HER2/neu em tumores

resulta na ativação constitutiva de c-src, que é característica da célula maligna, porém ausente da célula normal. Por outro lado, os camundongos deficientes na expressão de c-src apresentam um fenótipo osteoporótico, indicando a participação principal de c-src na função do osteoclasto e um possível envolvimento em distúrbios relacionados.

A família da Tec quinase, Bmx, uma proteína tirosina quinase não-receptora, controla a proliferação de células epiteliais mamárias cancerígenas.

O receptor de fator de crescimento de fibroblasto 3 mostrou exercer um efeito regulador negativo sobre o crescimento ósseo e uma inibição de proliferação de condrócitos. A displasia tanatofórica é causada por mutações diferentes em receptor do fator de crescimento de fibroblasto 3, e uma mutação, TDII FGFR3, possui uma atividade constitutiva de tirosina quinase que ativa o fator de transcrição Stat1, resultando em expressão de um inibidor de ciclo celular, parada do crescimento e desenvolvimento ósseo anormal (Su et al., Nature, 1997, 386, 288-292). FGFR3 também é geralmente expresso em múltiplos cânceres do tipo mieloma. Os inibidores de atividade de FGFR3 são úteis no tratamento de doenças inflamatórias ou auto-imunes mediadas por célula T, inclusive, porém sem caráter limitativo, artrite reumatóide (RA), artrite induzida por colágeno tipo II, esclerose múltipla (EM), lúpus eritematoso sistêmico (SLE), psoríase, diabetes juvenil, doença de Sjogren, doença da tireóide, sarcoidose, uveíte auto-imune, doença inflamatória do intestino (colite de Crohn e ulcerativa), doença celíaca e miastenia grave.

A atividade de soro e quinase regulada por glucocorticóide (SGK) está correlacionada com atividades de canal iônico agitadas, em particular, aquelas de canais de sódio e/ou potássio e compostos da invenção podem ser úteis para tratar hipertensão.

Lin et al (1997) J. Clin. Invest. 100, 8: 2072-2078 e P. Lin (1998) PNAS 95, 8829-8834, mostraram uma inibição de crescimento de tumor e vascularização e também uma redução em metástases pulmonares durante infecções adenovirais ou durante injeções do domínio extracelular de Tie-2

(Tek) em modelos de xenoenxerto de tumor de mama e melanoma. Os inibidores de Tie2 podem ser usados em situações onde a neovascularização ocorre de forma inapropriada (ou seja, em retinopatia diabética, inflamação crônica, psoríase, sarcoma de Kaposi, neovascularização crônica devido à
5 degeneração macular, artrite reumatóide, hemangioma infantil e cânceres).

Lck exerce uma função em sinalização de célula T. Os camundongos que são desprovidos do gene Lck possuem uma fraca capacidade de desenvolver timócitos. A função de Lck como um ativador positivo de sinalização de célula T sugere que os inibidores Lck podem ser úteis para tra-
10 tar doenças auto-imunes, tal como, artrite reumatóide.

JNKs, juntamente com outras MAPKs, estão envolvidas em apresentar uma função para mediar resposta celular a câncer, agregação de plaqueta induzida por trombina, distúrbios de imunodeficiência, doenças auto-imunes, morte celular, alergias, osteoporose e doença cardíaca. Os alvos
15 terapêuticos relacionados com a ativação da via de JNK incluem leucemia mielogenosa crônica (CML), artrite reumatóide, asma, osteoartrite, isquemia, câncer e doenças neurodegenerativas. Como um resultado da importância de ativação de JNK associada com doença do fígado ou episódios de isquemia hepática, os compostos da invenção também podem ser úteis para
20 tratar vários distúrbios hepáticos. Uma função de JNK em doenças cardiovasculares, tal como, infarto do miocárdio ou insuficiência cardíaca congestiva também foi relatada, conforme foi mostrado JNK media respostas hipertróficas a diversas formas de estresse cardíaco. Foi demonstrado que a cascata de JNK também exerce uma função na ativação de célula T, inclusive
25 ativação do promotor IL-2. Desta maneira, os inibidores de JNK podem possuir valor terapêutico na alteração de respostas imunes patológicas. Uma função da ativação de JNK em diversos cânceres também foi estabelecida, sugerindo-se o uso potencial de inibidores de JNK em câncer. Por exemplo, JNK constitutivamente ativada está associada com tumorigênese mediada
30 por HTLV-I [Oncogene 13:135-42 (1996)]. JNK pode exercer uma função em sarcoma de Kaposi (KS). Outros efeitos proliferativos de outras citocinas implicaram em proliferação de KS, tal como, fator de crescimento endotelial

vascular (VEGF), IL-6 e TNF α , também podem ser mediados por JNK. Ademais, a regulação do gene c-jun em células transformadas p210 BCR-ABL corresponde à atividade de JNK, sugerindo-se uma função de inibidores de JNK no tratamento de leucemia mielogenosa crônica (CML) [Blood 92:2450-60 (1998)].

Acredita-se que certas condições proliferativas anormais estão associadas com a expressão da raf e, portanto, acredita-se que sejam responsivas à inibição de expressão da raf. Níveis anormalmente altos de expressão da proteína raf também são envolvidos na transformação e proliferação de célula anormal. Também acredita-se que estas condições proliferativas anormais são responsivas à inibição de expressão da raf. Por exemplo, acredita-se que a expressão da proteína exerce uma função na proliferação celular anormal uma vez que foi relatado que 60% de todas as linhagens celulares de carcinoma pulmonar expressa níveis excepcionalmente altos de mRNA e proteína c-raf. Exemplos adicionais de condições proliferativas anormais são distúrbios hiperproliferativos, tais como, cânceres, tumores, hiperplasia, fibrose pulmonar, angiogênese, psoríase, aterosclerose e proliferação de célula do músculo liso nos vasos sanguíneos, tal como, estenose ou restenose após angioplastia. A via de sinalização celular cuja raf é uma parte também está envolvida em distúrbios inflamatórios caracterizados por proliferação de célula T (ativação e desenvolvimento de célula T), tais como, rejeição de enxerto de tecido, choque causador por endotoxina, e nefrite glomerular, por exemplo.

As proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs) são uma família de proteínas quinases que representam a penúltima etapa em vias de transdução de sinal que resultam na ativação do fator de transcrição de c-jun e expressão de genes regulados por c-jun. Em particular, c-jun está envolvido na transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas no reparo de DNA que está danificado devido a insultos genotóxicos. Portanto, os agentes que inibem a atividade de SAPK em uma célula impedem o reparo de DNA e sensibilizam a célula a agentes que induzem o dano de DNA ou inibem a síntese de DNA e induzem a apoptose de uma célula ou que ini-

bem a proliferação celular.

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) são elementos de vias de transdução de sinal conservadas que ativam os fatores de transcrição, fatores de tradução e outras moléculas-alvo em resposta a uma variedade de sinais extracelulares. MAPKs são ativadas por fosforilação em um motivo de fosforilação dupla que possui a seqüência Thr-X-Tyr por proteínas quinases ativadas por mitógeno (MKKs). Em eucariotos superiores, a função fisiológica de sinalização de MAPK foi correlacionada com eventos celulares, tais como, proliferação, oncogênese, desenvolvimento e diferenciação. Conseqüentemente, a capacidade de regular a transdução de sinal através destas vias (particularmente através de MKK4 e MKK6) poderia resultar no desenvolvimento de tratamentos e terapias preventivas para doenças humanas associadas com sinalização de MAPK, tais como, doenças inflamatórias, doenças auto-imunes e câncer.

A família de proteínas quinases S6 ribossomais humanas consiste em pelo menos 8 elementos (RSK1, RSK2, RSK3, RSK4, MSK1, MSK2, p70S6K e p70S6 Kb). As proteínas quinases ribossomais S6 exercem funções pleiotrópicas importantes, entre estas há uma função importante na regulação de tradução de mRNA durante a biossíntese da proteína (Eur. J. Biochem 2000 November; 267(21): 6321-30, Exp Cell Res. Nov. 25, 1999; 253 (1): 100-9, Mol Cell Endocrinol. 25 de maio, 1999;151(1-2):65-77). A fosforilação da proteína ribossomal S6 por p70S6 também foi envolvida na regulação de motilidade celular (Immunol. Cell Biol. Agosto de 2000; 78(4): 447-51) e crescimento celular (Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 2000;65: 101-27), e conseqüentemente, pode ser importante em metástase tumoral, a resposta imune e reparo de tecido bem como outras condições da doença.

As SAPK's (também chamadas de "quinases jun N-terminais" ou "JNK's") são uma família de proteínas quinases que representam a penúltima etapa em vias de transdução de sinal que resultam em ativação de fator de transcrição de c-jun e expressão de genes regulada por c-jun. Em particular, c-jun está envolvido na transcrição de genes que codificam proteínas envolvidas no reparo de DNA que é danificado devido a insultos genotóxi-

cos. Os agentes que inibem a atividade de SAPK em uma célula impedem o reparo de DNA e sensibilizam a célula àquelas modalidades terapêuticas de câncer ao induzir o dano de DNA.

5 BTK exerce uma função em doença auto-imune e/ou inflamatória, tal como, lúpus eritematoso sistêmico (SLE), artrite reumatóide, vasculite de múltipla, púrpura trombocitopênica idiopática (ITP), miastenia grave, e asma. Devido à função de BTK em ativação de célula B, os inibidores de BTK são úteis como inibidores de atividade patogênica mediada por célula B, tais como, produção de autoanticorpo, e são úteis no tratamento de linfoma e leucemia de células B.

10 CHK2 é um elemento da família de quinase de ponto de verificação de proteínas serina/treonina quinases e está envolvido em um mecanismo usado para inspeção de dano de DNA, tal como, dano causado por espécies reativas de oxigênio mutagênicas e endógenas ambientais. Como um resultado, este está envolvido como um supressor de tumor e alvo para terapia do câncer.

CSK influencia o potencial metastático de células cancerígenas, particularmente, câncer de cólon.

20 Fes é uma proteína tirosina quinase não-receptora que está envolvida em uma variedade de vias de transdução de sinal de citocina, bem como diferenciação de células mielóides.

Fes também é um componente importante do mecanismo de diferenciação de granulócito.

25 A atividade de tirosina quinase receptora Flt3 está envolvida em leucemias e síndrome mielodisplásica. Em aproximadamente 25% de AML as células de leucemia expressam uma forma constitutivamente ativa de tirosina quinase (p) FLT3 autofosforilada sobre a superfície celular. A atividade de p-FLT3 confere vantagem de crescimento e sobrevivência sobre as células leucêmicas. Pacientes com leucemia aguda, cujas células leucêmicas expressam atividade de quinase p-FLT3, possuem um prognóstico clínico total insatisfatório. A inibição de atividade de quinase p-FLT3 induz apoptose (morte celular programada) das células leucêmicas.

Os inibidores de IKK α e IKK β (1 & 2) são terapêuticos para doenças que incluem artrite reumatóide, rejeição de transplante, doença inflamatória do intestino, osteoartrite, asma, doença pulmonar obstrutiva crônica, aterosclerose, psoríase, esclerose múltipla, acidente vascular cerebral, lúpus eritematoso sistêmico, mal de Alzheimer, isquemia cerebral, lesão cerebral traumática, doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, hemorragia subaracnóide ou outras doenças ou distúrbios associados com a produção excessiva de mediadores inflamatórios no cérebro e sistema nervoso central.

Met está associado com a maior parte dos tipos dos cânceres humanos maiores e a expressão está geralmente correlacionada com o prognóstico insatisfatório e metástase. Os inibidores de Met são terapêuticos para doenças que incluem cânceres, tais como, câncer pulmonar, NSCLC (câncer de pulmão de célula não-pequena), câncer ósseo, câncer pancreático, câncer de pele, câncer de cabeça e pescoço, melanoma cutâneo ou intra-ocular, câncer uterino, câncer ovariano, câncer retal, câncer da região anal, câncer de estômago, câncer de cólon, câncer de mama, tumores ginecológicos (por exemplo, sarcomas uterinos, carcinoma das trompas de Falópio, carcinoma do endométrio, carcinoma do colo do útero, carcinoma da vagina ou carcinoma da vulva), Doença de Hodgkin, câncer do esôfago, câncer do intestino delgado, câncer do sistema endócrino (por exemplo, câncer da tireóide, paratireóide ou glândulas adrenais), sarcomas de tecidos macios, câncer da uretra, câncer do pênis, câncer da próstata, leucemia crônica ou aguda, tumores sólidos da infância, linfomas linfocíticos, câncer da bexiga, câncer do rim ou uretra (por exemplo, carcinoma de células renais, carcinoma da pélvis renal), malignidade pediátrica, neoplasmas do sistema nervoso central (por exemplo, linfoma primário do CNS, tumores da medula espinhal e do sistema nervoso central, glioma do tronco encefálico ou adenomas pituitários), cânceres do sangue, tais como, leucemia mielóide aguda, leucemia mielóide crônica, etc., doença cutânea neoplásica do esôfago de Barrett (síndrome pré-maligna) doença cutânea neoplásica, psoríase, micoses fungóides e hipertrofia prostática benigna, doenças relacionadas

com diabetes, tais como, retinopatia diabética, isquemia retiniana e neovascularização retiniana, cirrose hepática, doença cardiovascular, tal como, aterosclerose, doença imunológica, tal como, doença auto-imune e doença renal. De preferência, a doença é câncer, tal como, leucemia mielóide aguda e
5 câncer colorretal.

A quinase relacionada a Nima 2 (Nek2) é uma proteína quinase regulada por ciclo celular com atividade máxima no início da mitose que se localiza no centrossomo. Estudos funcionais envolveram Nek2 na regulação de separação de centrossomo e formação de fuso. A proteína Nek2 é elevada 2 a 5 vezes em linhagens celulares derivadas de uma faixa de tumores
10 humanos inclusive aqueles cervicais, ovarianos, de próstata, e particularmente, mama.

As doenças ou condições mediadas por p70S6K incluem, porém sem caráter limitativo, distúrbios proliferativos, tais como, câncer e esclerose
15 tuberosa.

De acordo com a descrição anterior, a presente invenção proporciona, adicionalmente, um método para prevenir ou tratar qualquer doença ou distúrbio descrito acima em um indivíduo necessitado de tal tratamento, tal método compreende administrar no dito indivíduo uma quantidade terapêuticamente eficaz {*Vide, "Administration and Pharmaceutical Compositions", infra*} de um composto da Fórmula I ou um sal farmaceuticamente aceitável deste. Para qualquer um dos usos acima, a dosagem requerida irá variar dependendo do modo de administração, da condição particular que será tratada e do efeito desejado.

25 Administração e Composições Farmacêuticas

Em geral, os compostos da invenção serão administrados em quantidades terapêuticamente eficazes através de qualquer um dos modos normais e aceitáveis conhecidos na técnica, tanto separadamente como em combinação com um ou mais agentes terapêuticos. Uma quantidade terapêuticamente eficaz pode variar bastante dependendo da gravidade da doença, da idade e saúde relativa do indivíduo, da potência do composto usado e outros fatores. Em geral, resultados satisfatórios são indicados para
30

serem obtidos de forma sistêmica em dosagens diárias de cerca de 0,03 a 2,5 mg/kg por peso de corpo. Uma dosagem diária indicada no mamífero maior, por exemplo, seres humanos, está na faixa de cerca de 0,5 mg a cerca de 100 mg, convenientemente administrada, por exemplo, em doses divididas de até quatro vezes por dia ou em forma retardada. As formas de dosagem única adequadas para administração oral compreendem de ca. 1 a 50mg de ingrediente ativo.

Os compostos da invenção podem ser administrados como composições farmacêuticas através de qualquer rota convencional, em particular de forma entérica, por exemplo, oral, por exemplo, na forma de comprimidos ou cápsulas, ou de forma parenteral, por exemplo, na forma de soluções ou suspensões injetáveis, de forma tópica, por exemplo, na forma de loções, géis, pomadas ou cremes, ou em uma forma nasal ou de supositório. As composições farmacêuticas que compreendem um composto da presente invenção na forma livre ou em uma forma de sal farmacêuticamente aceitável em associação com pelo menos um veículo ou diluente farmacêuticamente aceitável podem ser fabricadas de maneira convencional através de métodos de mistura, granulação ou revestimento. Por exemplo, as composições orais podem ser comprimidos ou cápsulas de gelatina que compreendem o ingrediente ativo juntamente com a) diluentes, por exemplo, lactose, dextrose, sacarose, manitol, sorbitol, celulose e/ou glicina; b) lubrificantes, por exemplo, sílica, talco, ácido esteárico, seu sal de magnésio ou cálcio e/ou polietilenoglicol; para comprimidos também c) aglutinantes, por exemplo, silicato de alumínio e magnésio, pasta de amido, gelatina, tragacanto, metilcelulose, carboximetilcelulose de sódio e/ou polivinilpirrolidona; se desejado d) desintegradores, por exemplo, amidos, ágar, ácido algínico ou seu sal de sódio, ou misturas efervescentes; e/ou e) absorventes, corantes, flavorizantes e adoçantes. As composições injetáveis podem ser soluções ou suspensões isotônicas aquosas, e supositórios podem ser preparados a partir de emulsões ou suspensões gordurosas. As composições podem ser esterilizadas e/ou conter adjuvantes, tais como, agentes conservantes, estabilizantes, umectantes ou emulsificantes, promotores de solução, sais para

regular a pressão osmótica e/ou tampões. Ademais, estas também podem conter outras substâncias terapeuticamente valiosas. As formulações adequadas para aplicações transdérmicas incluem uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção com um veículo. Um veículo pode incluir solventes absorvíveis farmacologicamente aceitáveis para auxiliar na passagem através da pele do hospedeiro. Por exemplo, os dispositivos transdérmicos estão sob a forma de uma bandagem que compreende um elemento de suporte, um reservatório que contém o composto opcionalmente com veículos, opcionalmente uma barreira de controle de taxa para entregar o composto na pele do hospedeiro em uma taxa controlada e predeterminada durante um período prolongado de tempo, e pretende fixar o dispositivo na pele. As formulações transdérmicas de matriz também podem ser usadas. As formulações adequadas para aplicação tópica, por exemplo, na pele e olhos, são, de preferência, soluções aquosas, pomadas, cremes ou géis bem-conhecidos na técnica. Tais podem conter solubilizantes, estabilizantes, agentes intensificadores de tonicidade, tampões e conservantes.

Os compostos da invenção podem ser administrados em quantidades terapeuticamente eficazes em combinação com um ou mais agentes terapêuticos (combinações farmacêuticas). Por exemplo, podem ocorrer efeitos sinérgicos com outras substâncias imunomoduladoras ou antiinflamatórias, por exemplo, quando usadas em combinação com ciclosporina, rapamicina, ou ascomicina, ou análogos imunossupressores destas, por exemplo, ciclosporina A (CsA), ciclosporina G, FK-506, rapamicina, ou compostos comparáveis, corticosteróides, ciclofosfamida, azatioprina, metotrexato, brequinar, leflunomida, mizoribina, ácido micofenólico, micofenolato de mofetila, 15-desoxispergualina, anticorpos imunossupressores, especialmente anticorpos monoclonais para receptores de leucócito, por exemplo, MHC, CD2, CD3, CD4, CD7, CD25, CD28, B7, CD45, CD58 ou seus ligantes, ou outros compostos imunomoduladores, tal como, CTLA41g. Quando os compostos da invenção forem administrados em conjunto com outras terapias, as dosagens dos compostos co-administrados irão variar, naturalmente, dependendo do tipo de co-fármaco empregado, do fármaco específico empre-

gado, da condição que será tratada e assim por diante.

A invenção também proporciona, para combinações farmacêuticas, por exemplo, um kit que compreende a) um primeiro agente que é um composto da invenção, conforme descrito aqui, em forma livre ou em forma de sal farmacêuticamente aceitável, e b) pelo menos um co-agente. O kit
5 pode compreender instruções para sua administração.

Os termos "co-administração" ou "administração combinada" ou similares, como utilizados aqui, pretendem incluir a administração dos agentes terapêuticos selecionados em um único paciente, e pretendem incluir regimes de tratamento onde os agentes não são necessariamente adminis-
10 trados pela mesma rota de administração ou ao mesmo tempo.

O termo "combinação farmacêutica", como usado, aqui se refere a um produto que resulta da mistura ou combinação de mais de um ingrediente ativo e inclui tanto combinações fixas como não-fixas dos ingredientes ativos. O termo "combinação fixa" significa que os ingredientes ativos, por exemplo, um composto da Fórmula I e um co-agente, são ambos adminis-
15 trados em um paciente de forma simultânea sob a forma de uma única entidade ou dosagem. O termo "combinação não-fixa" significa que os ingredientes ativos, por exemplo, um composto da Fórmula I e um co-agente, são
20 ambos administrados em um paciente como entidades separadas tanto de forma simultânea, concorrente como seqüencial sem limites de tempo específicos, onde tal administração proporciona níveis terapeuticamente eficazes dos 2 compostos no corpo do paciente. O último também se aplica a terapia com coquetel, por exemplo, a administração de 3 ou mais ingredientes ati-
25 vos.

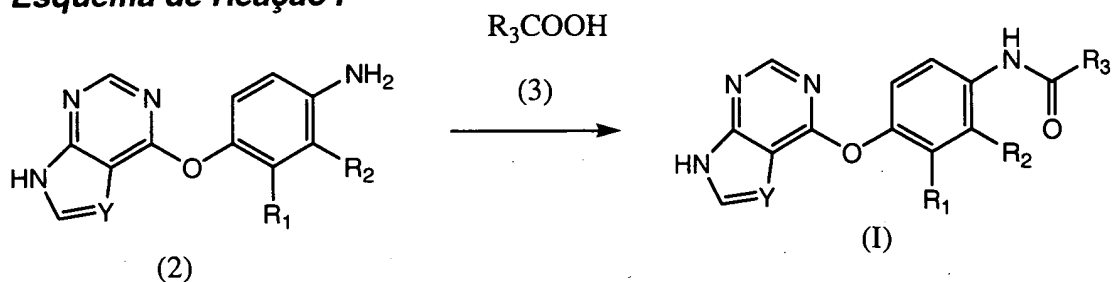
Processos para Fabricar os Compostos da Invenção

A presente invenção também inclui processos para a preparação de compostos da invenção. Nas reações descritas, pode ser necessário proteger os grupos funcionais reativos, por exemplo, grupos hidróxi, amino, imi-
30 no, tio ou carbóxi, onde estes são desejados no produto final, para evitar a participação indesejada nas reações. Os grupos de proteção convencionais podem ser usados de acordo com a prática-padrão, por exemplo, vide T.W.

Greene and P. G. M. Wuts em "Protective Groups in Organic Chemistry", John Wiley and Sons, 1991.

Os Compostos da Fórmula I podem ser preparados procedendo conforme no Esquema de Reação I a seguir:

5 **Esquema de Reação I**



10 onde Y, R₁, R₂ e R₂ são como definidos no Sumário da Invenção. Um composto da Fórmula I pode ser sintetizado ao reagir um composto da fórmula 2 com um composto da fórmula 3 na presença de um solvente adequado (por exemplo, DMF, diclorometano, tolueno, e similares), uma base adequada (por exemplo, trietilamina, DIPEA, Na₂CO₃, e similares) e um agente de acoplamento adequado (por exemplo, DCC, HATU, e similares). A reação procede em uma faixa de temperatura de cerca de 0°C a cerca de 50°C e pode levar até cerca de 24 horas para ser concluída.

15 Exemplos detalhados da síntese de um composto da Fórmula I podem ser encontrados nos Exemplos, *infra*.

Processos Adicionais para Fabricar os Compostos da Invenção

20 Um composto da invenção pode ser preparado como um sal de adição de ácido farmacologicamente aceitável ao reagir a forma de base livre do composto com um ácido inorgânico ou orgânico farmacologicamente aceitável. Alternativamente, um sal de adição de base farmacologicamente aceitável de um composto da invenção pode ser preparado ao reagir a forma de ácido livre do composto com uma base inorgânica ou orgânica farmacologicamente aceitável.

25 Alternativamente, as formas de sal dos compostos da invenção podem ser preparadas utilizando sais dos materiais de partida ou intermediários.

As formas de ácido livre ou base livre dos compostos da invenção

ção podem ser preparadas a partir da forma de sal de adição de base ou sal de adição de ácido correspondente, respectivamente.

5 Por exemplo, um composto da invenção em uma forma de sal de adição de ácido pode ser convertido na base livre correspondente através de tratamento com uma base adequada (por exemplo, solução de hidróxido de amônio, hidróxido de sódio, e similares). Um composto da invenção em uma forma de sal de adição de base pode ser convertido no ácido livre correspondente através de tratamento com um ácido adequado (por exemplo, ácido clorídrico, etc).

10 Os compostos da invenção em forma não-oxidada podem ser preparados a partir de N-óxidos dos compostos da invenção através de tratamento com um agente de redução (por exemplo, enxofre, dióxido de enxofre, trifetil fosfina, boridreto de lítio sódio, boridreto de sódio, tricloreto fosforoso, tribrometo, ou similares) em um solvente orgânico inerte adequado
15 (por exemplo, acetonitrila, etanol, dioxano aquoso ou similares) a 0 a 80°C.

Os derivados de pró-fármaco dos compostos da invenção podem ser preparados através de métodos conhecidos pelos versados na técnica (por exemplo, para detalhes adicionais vide Saulnier et al., (1994), Bio-organic and Medicinal Chemistry Letters, Vol. 4, p. 1985). Por exemplo, os
20 pró-fármacos podem ser preparados ao reagir um composto não-derivatizado da invenção com um agente de carbamilação adequado (por exemplo, 1,1-aciloxialquilcarbanocloridato, carbonato de paranitrofenila, ou similares).

Os derivados protegidos dos compostos da invenção podem ser
25 feitos através de meios conhecidos pelos versados na técnica. Uma descrição detalhada de técnicas aplicáveis para a criação de grupos de proteção e sua remoção podem ser encontrados em T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Chemistry", 3rd edition, John Wiley and Sons, Inc., 1999.

Os compostos da presente invenção podem ser convenientemente
30 preparados, ou formadas durante o processo da invenção, como solvatos (por exemplo, hidratos). Os hidratos de compostos da presente invenção podem ser convenientemente preparados por recristalização de uma

mistura de solvente aquoso/orgânico, utilizando solventes orgânicos, tais como, dioxina, tetraidrofurano ou metanol.

Os compostos da invenção podem ser preparados como seus estereoisômeros individuais ao reagir uma mistura racêmica do composto com um agente de resolução opticamente ativo para formar um par de compostos diastereoisoméricos, separar os diastereômeros e recuperar os enantiômeros opticamente puros. Embora a resolução de enantiômeros possa ser realizada utilizando derivados diastereoméricos covalentes dos compostos da invenção, os complexos dissociáveis são preferidos (por exemplo, sais diastereoméricos cristalinos). Os diastereômeros possuem propriedades físicas distintas (por exemplo, pontos de fusão, pontos de ebulição, solubilidades, reatividade, etc) e podem ser facilmente separados tirando vantagem destas desigualdades. Os diastereômeros podem ser separados por cromatografia, ou de preferência, por técnicas de separação/resolução baseadas nas diferenças em solubilidade. O enantiômero opticamente puro é então recuperado, juntamente com o agente de resolução, através de um meio prático que poderia não resultar em racemização. Uma descrição mais detalhada das técnicas aplicáveis à resolução de estereoisômeros de compostos de sua mistura racêmica pode ser encontrada em Jean Jacques, Andre Collet, Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley And Sons, Inc., 1981.

Em suma, os compostos da Fórmula I podem ser feitos através de um processo que envolve:

- (a) aquele do esquema de reação I; e
- (b) converter opcionalmente um composto da invenção em um sal farmaceuticamente aceitável;
- (c) converter opcionalmente uma forma de sal de um composto da invenção em uma forma de não-sal;
- (d) converter opcionalmente uma forma não-oxidada de um composto da invenção em um N-óxido farmaceuticamente aceitável;
- (e) converter opcionalmente uma forma de N-óxido de um

- composto da invenção em sua forma não-oxidada;
- (f) separar opcionalmente um isômero individual de um composto da invenção de uma mistura de isômeros;
- (g) converter opcionalmente um composto não-derivatizado da invenção em um derivado de pró-fármaco farmacologicamente aceitável; e
- (h) converter opcionalmente um derivado de pró-fármaco de um composto da invenção em sua forma não-derivatizada.

Embora a produção dos materiais de partida não sejam particularmente descritas, os compostos são conhecidos ou podem ser preparados de forma análoga através de métodos conhecidos na técnica ou conforme descrito nos Exemplos a seguir.

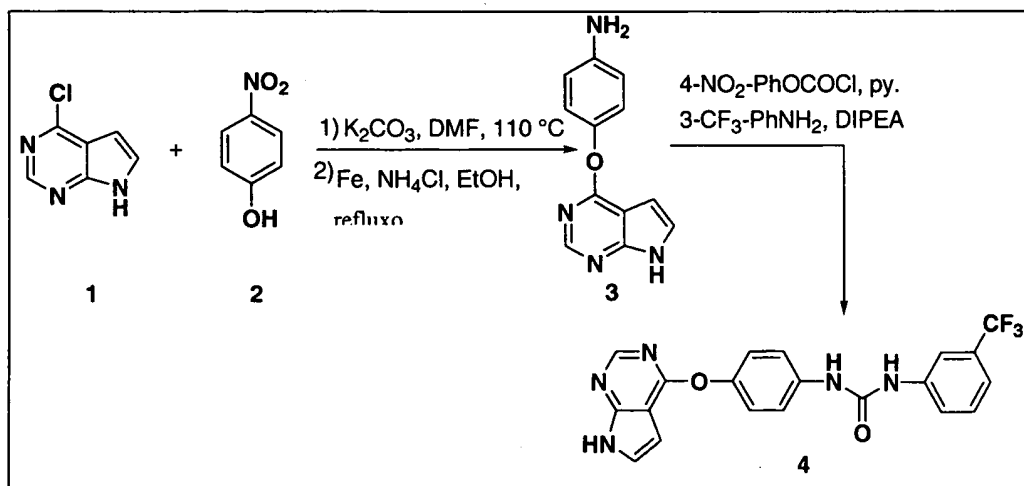
Um versado na técnica irá avaliar que as transformações acima são apenas representativas de métodos para a preparação dos compostos da presente invenção, e que outros métodos bem-conhecidos podem ser similarmente usados.

Exemplos

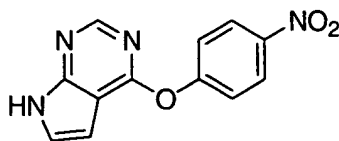
A presente invenção é adicionalmente exemplificada, porém não é limitada, pelos exemplos a seguir que ilustram a preparação de compostos da Fórmula I de acordo com a invenção.

Exemplo 1

Síntese de 1-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-iloxifenil)-3-(3-trifluorometil-fenil)-uréia (4)

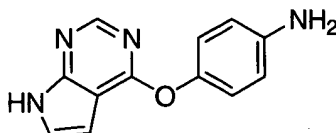


4-(4-Nitro-fenóxi)-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina:



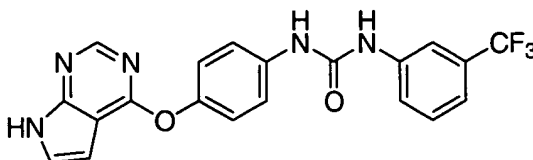
A uma solução de 4-Cloro-7H-pirrolo[2,3-d]pirimidina (3,1 g, 20 mmols) dissolvida em DMF (60 ml) são adicionados 4-nitrofenol (4,9 g, 35 mmols) e carbonato de potássio (5,3 g, 38 mmols). A solução resultante é aquecida a 110°C durante a noite. Após o término da reação como indicado pelo desaparecimento do material de partida, a mistura de reação é resfriada a temperatura ambiente e despejada em água fria. Os sólidos resultantes são coletados por filtração e lavados com água (3 x 100 ml). O produto bruto é purificado por cromatografia em coluna instantânea utilizando hexanos: acetato de etila (1/1 v/v) como eluente para produzir o composto do título como um sólido: ¹H RMN 400 MHz (DMSO_d₆) δ 12,34 (bs, 1H), 8,35 (m, 3H), 7,57 (m, 3H), 6,61 (m, 1H); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₁₂H₉N₄O₃ [MH]⁺ 257,0669, encontrado 257,0670,

4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenilamina



Este composto é obtido a partir da redução do grupo nitro correspondente utilizando métodos conhecidos na técnica: EM m/z 227,1 (M + 1).

1-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-3-(3-trifluorometilfenil)-uréia

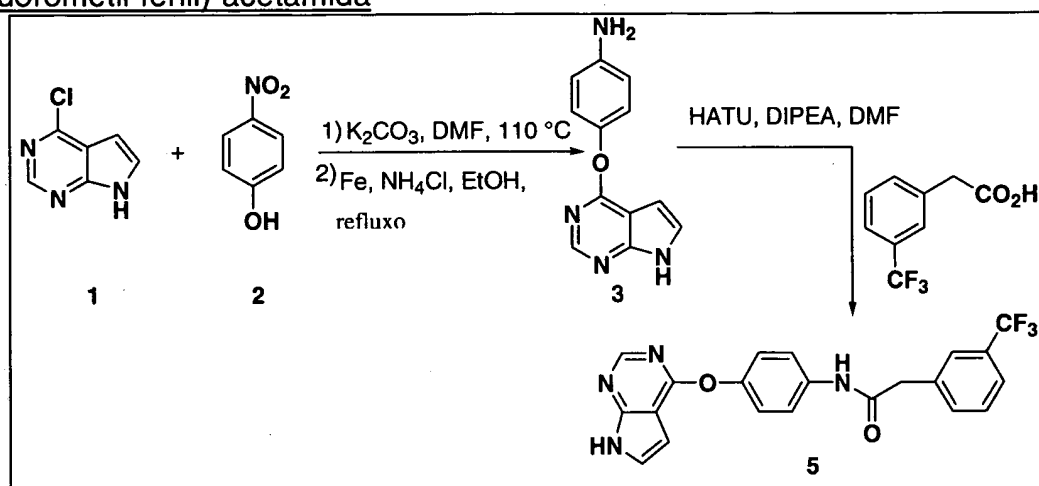


A uma solução de 3-(trifluorometil)anilina (0,013 ml, 1 mmol), em diclorometano (2 ml) são adicionados clorofornato de 4-nitrofenila (0,020 ml, 1 mmol) e piridina (0,008 ml, 1 mmol). A mistura de reação é agitada durante 5 minutos, após isto 4 (0,018 g, 0,78 mmol) e N,N-diisopropil etilamina (0,134 ml, 0,78 mmol) são adicionados. A reação resultante é agitada duran-

te 1 hora em temperatura ambiente após este tempo a análise LC-EM revelou o desaparecimento de 3. O solvente é removido a vácuo e o resíduo resultante é dissolvido em DMSO (1 ml). A solução resultante é purificada por LC-EM em fase reversa para produzir o composto do título como o sal de ácido trifluoroacético: ^1H RMN 400 MHz (DMSO $_d_6$) δ 12,19 (s, 1H), 8,98 (s, 1H), 9,1 (s, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,28 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,58 (m, 1H), 7,52 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,51-7,50 (m, 1H), 7,43 (t, $J = 2,8$ Hz, 1H), 7,31 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,18 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H), 6,42 (m, 1H); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para C₂₀H₁₅F₃N₅O₂ [MH]⁺ 414,1172, encontrado 414,1169.

10 Exemplo 2

Síntese de N-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-2-(3-trifluorometil-fenil)-acetamida



A uma solução de 3 (0,020 g, 0,088 mmol), ácido (3-trifluorometil-fenil)-acético (0,020 g, 0,10 mmol), e N,N-diisopropil etilamina (17,2 μ l, 0,1 mmol) em dimetilformamida (0,5 ml) adiciona-se hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (0,036 g, 0,096 mmol). Após agitação durante 1 hora em temperatura ambiente, a mistura de reação bruta é dividida entre acetato de etila e água. As camadas orgânicas são separadas, secas através de sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas a vácuo para fornecer o produto bruto. O resíduo é dissolvido em DMSO (1 ml) e a solução resultante é purificada através de LC-EM em fase reversa para produzir o composto do título como um sal de ácido trifluoroacético: ^1H RMN 400 MHz (DMSO- d_6) δ 12,13 (bs, 1H), 10,38 (bs, 1H),

8,27 (s, 1H), 7,71 (s, 1H), 7,6-7,66 (m, 5H), 7,43 (m, 1H), 7,19 (d, $J = 9,2$ Hz, 2H), 6,41 (m, 1H) 3,82 (s, 2H); HRMS (MALDI-FTMS) calculado para $C_{21}H_{16}F_3N_4O_2$ $[MH]^+$ 413,1220, encontrado 413,1222.

- 5 Ao repetir os procedimentos descritos nos exemplos acima, utilizando-se materiais de partida apropriados, os seguintes compostos da Fórmula I, como identificado na Tabela 1, são obtidos.

Tabela 1

Nº composto	Estrutura	Dados físico 1H RMN 400 MHz (DM-SO- d_6) e/ou MS (m/z)
3		1H RMN 400 MHz (DM-SO- d_6) δ 12,09 (s, 1H), 9,09 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,87 (s, 1H), 7,53 (s, 2H), 7,42 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,33 (m, 1H), 7,07 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,32 (m, 1H), 3,56 (s, 2H), 3,01 (q, $J = 8,8$ Hz, 2H), 2,84-2,87 (m, 8H), 1,1 (t, $J = 7,2$ Hz, 3H) MS m/z 540,2 (M + 1).
4		1H RMN 400 MHz (DM-SO- d_6) δ 12,22 (s, 1H), 9,66 (s, 1H), 9,51 (s, 1H), 9,36 (s, 1H), 8,31 (s, 1H), 8,16 (s, 1H), 8,01 (d, $J = 12,0$ Hz, 1H), 7,77 (s, 1H), 7,59 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 7,48 (t, $J = 2,4$ Hz, 1H), 7,23 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), 6,95 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H), 6,46 (m, 1H), 2,36 (s, 3H) MS m/z 494,1 (M + 1).
5		MS m/z 406,1 (M + 1).
6		1H RMN 400 MHz DMSO- d_6 δ 9,1 (s, 1H), 8,9 (s, 1H), 8,5 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,01 (s, 1H), 7,56 (m, 1H) 7,52-7,55 (m, 3H), 7,32 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H), 7,22 (d, $J = 8,8$ Hz, 2H), MS m/z 415,1 (M + 1),

Tabela 1 continuação

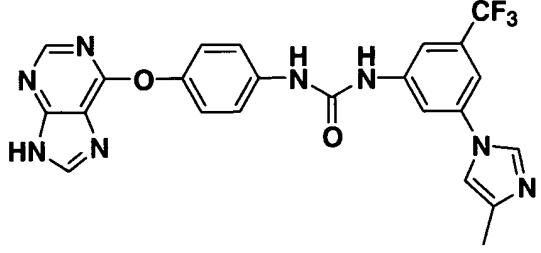
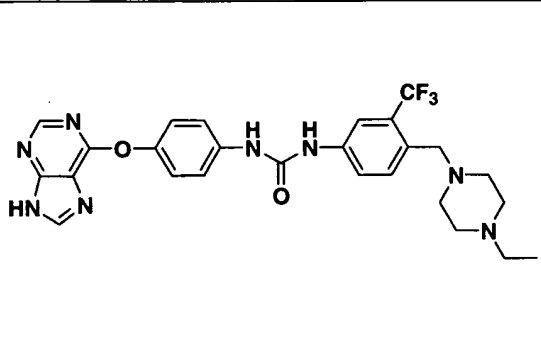
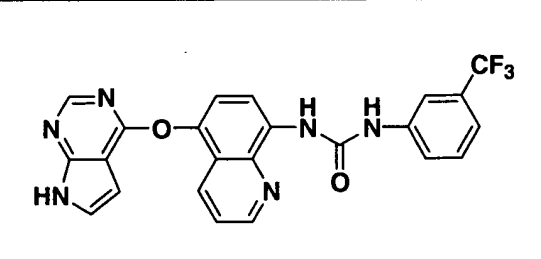
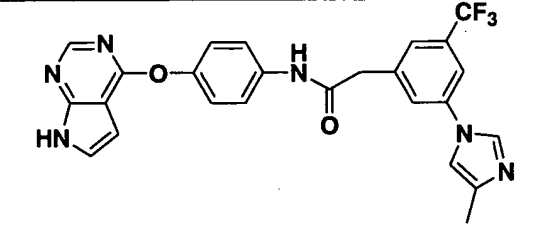
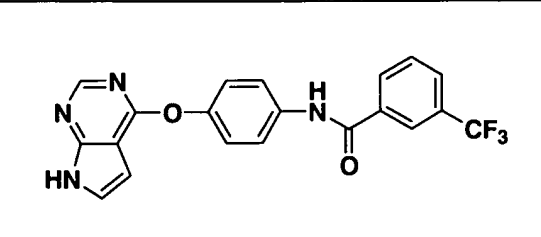
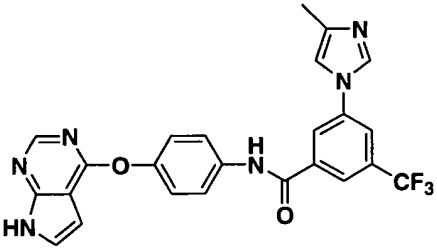
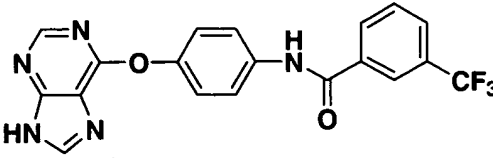
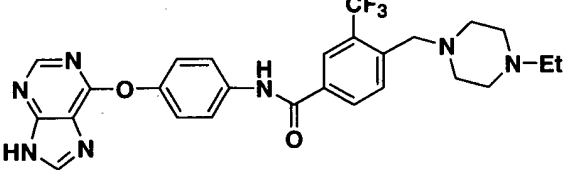
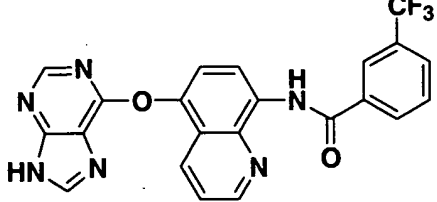
Nº composto	Estrutura	Dados físico ¹ H RMN 400 MHz (DM-SO- <i>d</i> ₆) e/ou MS (<i>m/z</i>)
7		¹ H RMN 400 MHz DMSO- <i>d</i> ₆) δ 9,59 (s, 1H), 9,43 (s, 1H), 9,31 (s, 1H), 8,51 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,11 (s, 1H), 7,97 (s, 2H), 7,74 (s, 1H), 7,57 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8 Hz), 7,25 (d, 2H, <i>J</i> = 8,8 Hz), 2,34 (s, 3H) MS <i>m/z</i> 495,1 (<i>M</i> + 1),
8		¹ H RMN 400 MHz (DM-SO- <i>d</i> ₆) δ 9,2 (s, 1H), 9,02 (s, 1H), 8,5 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,97 (s, 1H), 7,63 (s, 2H), 7,53 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,21 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 6,32 (m, 1H), 3,64 (s, 2H), 3,1 (q, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 2,94-2,97 (m, 8H), 1,2 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H) MS <i>m/z</i> 541,2 (<i>M</i> + 1).
9		¹ H RMN 400 MHz (DM-SO- <i>d</i> ₆) δ 11,07 (bs, 1H), 8,91 (s, 1H), 8,13 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7,96 (s, 1H), 7,49 (m, 1H), 7,45 (m, 1H), 7,22 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 1H), 6,93 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 6,01 (s, 2H) MS <i>m/z</i> 465,1 (<i>M</i> + 1).
10		MS <i>m/z</i> 493,1 (<i>M</i> + 1).
11		¹ H RMN 400 MHz (DM-SO- <i>d</i> ₆) δ 10,52 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,36 (s, 1H), 8,21-8,25 (m, 2H), 7,92 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 1H), 7,74-7,77 (m, 3H), 7,23 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 6,48 (s, 1H), MS <i>m/z</i> 399,1 (<i>M</i> + 1).

Tabela 1 continuação

Nº composto	Estrutura	Dados físico ¹ H RMN 400 MHz (DM-SO- <i>d</i> ₆) e/ou MS (<i>m/z</i>)
12		¹ H RMN 400 MHz (DM-SO- <i>d</i> ₆) δ 12,24 (bs, 1H), 10,74 (s, 1H), 9,59 (s, 1H), 8,59 (s, 1H), 8,45 (d, <i>J</i> = 12,0 Hz, 1H), 8,30 (s, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,83 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H), 7,46 (m, 1H), 7,31 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 6,46 (m, 1H), 2,36 (s, 3H) MS <i>m/z</i> 479,1 (M + 1).
13		¹ H RMN 400 MHz (DM-SO- <i>d</i> ₆) δ 8,49 (s, 1H), 8,42 (s, 1H), 8,28 (m, 2H), 7,98 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 7,80-7,83 (m, 3H), 7,31 (s, 1H), 7,29 (s, 1H) MS <i>m/z</i> 400,1 (M + 1).
14		MS <i>m/z</i> 526,2 (M + 1).
15		MS <i>m/z</i> 451,1 (M + 1).

Ensaio

Os compostos da presente invenção são analisados para medir sua capacidade de inibir seletivamente a proliferação celular de células 32D que expressam BCR-Abl (32D-p210) comparadas com células 32D de origem. Os compostos que inibem seletivamente a proliferação destas células BCR-Abl transformadas são testados para atividade antiproliferativa sobre as células Ba/F3 que expressam tanto formas do tipo selvagem como mutantes de Bcr-abl. Ademais, os compostos são analisados para medir sua capacidade de inibir Abl, Bcr-Abl, Aurora-A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K,

PDGFRa, PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Syk, Tie2 e TrkB quinases.

Inibição de proliferação dependente de BCR-Abl celular (Método de Alto Rendimento)

5 A linhagem celular de murino usada é a linhagem celular de progenitor hemopoiético 32D transformada em cDNA de BCR-Abl (32D-p210). Estas células são mantidas em RPMI/10% de soro bovino fetal (RPMI/FCS) suplementado com 50 μ g/mL de penicilina, 50 μ g/mL de estreptomicina e 200 mM de L-glutamina. As células 32D não-transformadas são similarmente mantidas com a adição de 15% de meio condicionado de WEHI como uma fonte de IL3.

10 50 μ l de uma suspensão de células 32D ou 32D-p210 são semeados em microplacas de 384 cavidades Greiner (pretas) em uma densidade de 5000 células por cavidade. 50nl do composto de teste (1 mM em solução estoque de DMSO) são adicionados em cada cavidade (STI571 está incluído como um controle positivo). As células são incubadas durante 72 horas a 37°C, 5% de CO₂. 10 μ l de 60% de uma solução Alamar Blue (diagnósticos de Tek) são adicionados a cada cavidade e as células são incubadas durante um adicional de 24 horas. A intensidade de fluorescência (Excitação a 530 nm, Emissão a 580 nm) é quantificada utilizando o sistema Acquest® (Molecular Devices).

Inibição de proliferação dependente de BCR-Abl celular

25 As células 32D-p210 são semeadas em placas TC de 96 cavidades em uma densidade de 15.000 células por cavidade. 50 μ L de diluições em séries de duas partes do composto de teste (C_{max} é 40 μ M) são adicionados a cada cavidade (STI571 está incluído como um controle positivo). Após a incubação das células durante 48 horas a 37°C, 5% de CO₂, 15 μ L de MTT (Promega) são adicionados a cada cavidade e as células são incubadas durante um adicional de 5 horas. A densidade óptica a 570 nm é quantificada de forma espectrofotométrica e valores IC50, a concentração de composto requerida para 50% de inibição, determinada a partir de uma curva dose-resposta.

30

Efeito sobre a distribuição de ciclo celular

As células 32D e 32D-p210 são semeadas em placas TC 6 cavidades a $2,5 \times 10^6$ células por cavidade em 5 ml de meio e adiciona-se o composto de teste a 1 ou 10 μM (STI571 está incluído como um controle). As células são então incubadas durante 24 ou 48 horas a 37°C , 5% de CO_2 . 2 ml de suspensão celular são lavados com PBS, fixados em 70% de EtOH durante 1 hora e tratados com PBS/EDTA/RNase A durante 30 minutos. O iodeto de propídeo (Cf = 10 $\mu\text{g/ml}$) é adicionado e a intensidade de fluorescência é quantificada por citometria de fluxo sobre o sistema FACScalibur® (BD Biosciences). Os compostos de teste da presente invenção demonstram um efeito apoptótico sobre as células 32D-p210, porém não induzem apoptose nas células 32D de origem.

Efeito sobre a Autofosforilação de BCR-Abl celular

A autofosforilação de BCR-Abl é quantificada com Elisa de captura utilizando um anticorpo de captura específico de c-abl e um anticorpo antifosfotirosina. As células 32D-p210 são semeadas em placas TC de 96 cavidades em 2×10^5 células por cavidade em 50 μL de meio. 50 μL de diluições em séries de duas partes de compostos de teste (C_{max} é 10 μM) são adicionados a cada cavidade (STI571 está incluído como um controle positivo). As células são incubadas durante 90 minutos a 37°C , 5% de CO_2 . As células são então tratadas durante 1 hora em gelo com 150 μL de tampão de lise (50 mM de Tris-HCl, pH 7,4, 150 mM de NaCl, 5 mM de EDTA, 1 mM de EGTA e 1% de NP-40) que contém inibidores da protease e fosfatase. 50 μL de lisato celular são adicionados a optiplacas de 96 cavidades anteriormente revestidas com anticorpo específico de anti-abl e bloqueadas. As placas são incubadas durante 4 horas a 4°C . Após a lavagem com tampão TBS-Tween 20, 50 μL de anticorpo antifosfotirosina conjugado por fosfatase alcalina são adicionados e a placa é, adicionalmente, incubada durante a noite a 4°C . Após a lavagem com tampão TBS-Tween 20, 90 μL de um substrato luminescente são adicionados e a luminescência é quantificada utilizando o sistema Acquest® (Molecular Devices). Os compostos de teste da invenção que inibem a proliferação das células que expressam BCR-Abl, inibem a autofos-

forilação de BCR-Abl celular de maneira dependente de dose.

Efeito sobre a proliferação de células que expressam formas mutantes de Bcr-abl

Os compostos da invenção são testados para seu efeito antiproliferativo sobre as células Ba/F3 que expressam tanto formas do tipo selvagem como mutantes de BCR-Abl (G250E, E255V, T315I, F317L, M351T) que confere resistência ou sensibilidade diminuída a STI571. O efeito antiproliferativo destes compostos sobre as células que expressam BCR-Abl mutante e sobre as células não-transformadas foram testadas em 10, 3,3, 1,1 e 0,37 μM conforme descrito acima (em meio desprovido de IL3). Os valores IC₅₀ dos compostos desprovidos de toxicidade sobre as células não-transformadas foram determinados a partir das curvas dose-resposta obtidas como descrito acima.

FGFR3 (Análise Enzimática)

A análise de atividade de quinase com FGFR3 purificada (Upstate) é realizada em um volume final de 10 μL que contém 0,25 $\mu\text{g/mL}$ de enzima em tampão quinase (30 mM de Tris-HCl pH 7,5, 15 mM de MgCl_2 , 4,5 mM de MnCl_2 , 15 μM de Na_3VO_4 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de BSA), e substratos (5 $\mu\text{g/mL}$ de biotina-poli-EY(Glu, Tyr) (CIS-US, Inc.) e 3 μM de ATP). Duas soluções são feitas: a primeira solução de 5 μl que contém a enzima FGFR3 em tampão quinase primeiramente foi distribuída em formato 384 ProxiPlate® (Perkin-Elmer) seguida por adição de 50 nL de compostos dissolvidos em DMSO, então 5 μl da segunda solução contém o substrato (poli- EY) e ATP em tampão quinase foram adicionados a cada cavidade. As reações são incubadas em temperatura ambiente durante uma hora, interrompidas pela adição de 10 μL de mistura de detecção de HTRF, que contém 30 mM de Tris-HCl pH 7,5, 0,5 M de KF, 50 mM de ETDA, 0,2 mg/mL de BSA, 15 $\mu\text{g/mL}$ de estreptavidina-XL665 (CIS-US, Inc.) e 150 ng/mL de anticorpo antifosfotirosina conjugado por criptato (CIS-US, Inc.). Após uma hora de incubação em temperatura ambiente para permitir a interação de estreptavidina-biotina, os sinais fluorescentes separados por tempo são lidos em Analyst GT (Molecular Devices Corp.). Os valores IC₅₀ são calculados por análise de regressão

linear da percentagem de inibição de cada composto em 12 concentrações (diluição 1:3 de 50 μ M a 0,28 nM). Nesta análise, os compostos da invenção possuem IC₅₀ na faixa de 10 nM a 2 μ M.

FGFR3 (Análise Celular)

5 Os compostos da invenção são testados para sua capacidade de inibir a proliferação de células Ba/F3-TEL-FGFR3 transformadas, que depende da atividade de quinase celular FGFR3. Ba/F3-TEL-FGFR3 são cultivadas até 800.000 células/mL em suspensão, com RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal como o meio de cultura. As células
10 são distribuídas em placa de formato de 384 cavidades em 5000 células/cavidade em 50 μ L de meio de cultura. Os compostos da invenção são dissolvidos e diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). Doze pontos de diluições em série 1:3 são feitos em DMSO para gerar gradiente de concentrações que varia tipicamente de 10 mM a 0,05 μ M. As células são adicionadas com
15 50 nL de compostos diluídos e incubados durante 48 horas em incubador de cultura celular. AlamarBlue® (TREK Diagnostic Systems), que pode ser usado para monitorar o ambiente de redução criado pela proliferação de células, é adicionada às células em concentração final de 10%. Após quatro horas adicionais de incubação em um incubador de cultura celular a 37°C, os si-
20 nais de fluorescência de AlamarBlue® (Excitação a 530 nm, Emissão em 580 nm) são quantificados em Analyst GT (Molecular Devices Corp.). Os valores IC₅₀ são calculados por análise de regressão linear da percentagem de inibição de cada composto em 12 concentrações.

FLT3 e PDGFR β (Análise Celular)

25 Os efeitos de compostos da invenção sobre a atividade celular de FLT3 e PDGFR β são conduzidos utilizando métodos idênticos conforme descrito acima para atividade celular de FGFR3, exceto que em vez de se utilizar Ba/F3-TEL-FGFR3, Ba/F3-FLT3-ITD e Ba/F3-Tel-PDGFR β são usadas, respectivamente.

30 Análise enzimática de b-Raf

Os compostos da invenção são testados para sua capacidade de inibir a atividade de b-Raf. A análise é realizada em placas MaxiSorp de

384 cavidades (NUNC) com paredes pretas e fundo claro. O substrato, I κ B α é diluído em DPBS (1:750) e 15 μ l são adicionados a cada cavidade. As placas são incubadas a 4°C durante a noite e lavadas 3 vezes com TBST (25 mM de Tris, pH 8,0, 150 mM de NaCl e 0,05% de Tween-20) utilizando a lavadora de placas EMBLA. As placas são bloqueadas por Superblock (15 μ l/cavidade) durante 3 horas em temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com TBST e secas. O tampão de análise que contém 20 μ M de ATP (10 μ l) é adicionado a cada cavidade seguido por 100 nl ou 500 nl de composto. B-Raf é diluída no tampão de análise (1 μ l em 25 μ l) e 10 μ l de b-Raf diluída são adicionadas a cada cavidade (0,4 μ g/cavidade). As placas são incubadas em temperatura ambiente durante 2,5 horas. A reação de quinase é interrompida ao lavar as placas 6 vezes com TBST. O anticorpo Phosph-I κ B α (Ser32/36) é diluído em Superblock (1:10.000) e 15 μ l são adicionados a cada cavidade. As placas são incubadas a 4°C durante a noite e lavadas 6 vezes com TBST. IgG de cabra anti-camundongo conjugado por AP é diluído em Superblock (1: 1.500) e 15 μ l são adicionados a cada cavidade. As placas são incubadas em temperatura ambiente durante 1 hora e lavadas 6 vezes com TBST. 15 μ l de substrato AP Attofos fluorescente (Promega) são adicionados a cada cavidade e as placas são incubadas em temperatura ambiente durante 15 minutos. As placas são lidas em Acquest ou Analyst GT utilizando um Programa de Intensidade de Fluorescência (Excitação 455 nm, Emissão 580 nm).

Análise celular de b-Raf

Os compostos da invenção são testados em células A375 para sua capacidade de inibir fosforilação de MEK. A linhagem celular A375 (ATCC) é derivada de um paciente humano com melanoma e esta possui uma mutação V599E sobre o gene de B-Raf. Os níveis de MEK fosforilada são elevados devido à mutação de B-Raf. As células subconfluentes a confluentes A375 são incubadas com compostos durante 2 horas a 37°C em meio isento de soro. As células são, então, lavadas uma vez com PBS gelado e listadas com tampão de lise que contém 1% de Triton X100. Após centrifugação, os sobrenadantes são submetidos a SDS-PAGE, e então transfe-

ridos para membranas de nitrocelulose. As membranas são então submetidas a western blotting com anticorpo antifosfo-MEK (ser217/221) (Sinalização Celular). A quantidade de MEK fosforilada é monitorada pela densidade de faixas de fosfo-MEK sobre as membranas de nitrocelulose.

5 Análise Antimalárica utilizando SYBR Green I

Os compostos da presente invenção podem ser analisados para medir sua capacidade de inibir a proliferação de parasitemia em glóbulos vermelhos infectados. A proliferação é quantificada pela adição do corante SYBR Green I (Invitrogen)[®] que possui uma alta afinidade a DNA de cadeia dupla.

Para a triagem de fármacos, 20 µl de meio de triagem, que não contém soro humano, são distribuídos em 3 placas de análise. 50 nl de cada composto da invenção, inclusive controles antimaláricos (cloroquina e artimesinina), são então transferidos para as placas de análise. 50 nl de DMSO são transferidos na linha de base e placas de controle de base. Então, 30 µl de uma suspensão de glóbulos vermelhos humanos infectados por *P. falciparum* em meio de triagem são distribuídos nas placas de análise e na placa de controle de linha de base de modo que hematócrito final seja 2,5% com uma parasitemia final de 3%. Os glóbulos vermelhos não-infectados são distribuídos na placa de controle de base de modo que o hematócrito final seja 2,5%. As placas são colocadas em uma incubadora a 37°C durante 72 horas com 93% de N₂, 4% de CO₂, e 3% de mistura de gás O₂. 10 µl de uma solução 10 X de SYBR Green I[®] são distribuídos nas placas. As placas são vedadas e colocadas em um refrigerador a -80°C durante a noite para a lise dos glóbulos vermelhos. As placas são descongeladas e deixadas em temperatura ambiente durante a noite para coloração ótima. A intensidade de fluorescência é medida (excitação 497nm, emissão 520nm) utilizando o sistema Acquest (Molecular Devices). A porcentagem de inibição é calculada para cada composto.

30 Análise de Ligação de filtro radio enzimática-Upstate KinaseProfiler[®]

Os compostos da invenção são avaliados para sua capacidade de inibir elementos individuais do painel de quinase. Os compostos são tes-

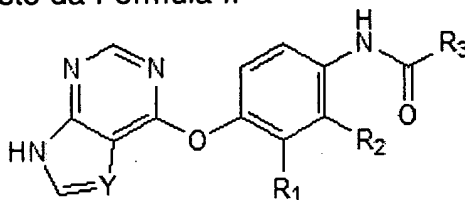
tados em duplicatas em uma concentração a de 10 μ M seguindo este protocolo genérico. Nota-se que a composição de tampão de quinase e os substratos variam pelas quinases diferentes no painel "Upstate KinaseProfiler®". O tampão de quinase (2,5 μ L, 10x – que contém $MnCl_2$ quando requerido),
5 quinase ativa (0,001-0,01 Unidades; 2,5 μ L), específico ou Poli(Glu4-Tyr)peptídeo (5-500 μ M ou 0,01 mg/ml) em tampão de quinase e tampão de quinase (50 μ M; 5 μ L) são misturados em um tubo eppendorf em gelo. Uma mistura de Mg/ATP (10 μ L; 67,5 (ou 33,75) mM de $MgCl_2$, 450 (ou 225) μ M de ATP e 1 μ Ci/ μ l [γ - ^{32}P]-ATP (3000Ci/mmol)) é adicionada e a reação é incubada a cerca de 30°C durante cerca de 10 minutos. A mistura de reação é aplicada em pontos (20 μ L) em um quadrado de papel de 2cm x 2cm P81 (fosfocelulose, para substratos de peptídeo positivamente carregados) ou Whatman No. 1 (para substrato de Poli(Glu4-Tyr) peptídeo). Os quadrados da análise são lavados 4 vezes, durante 5 minutos cada, com 0,75% de ácido fosfórico e lavados uma vez com acetona durante 5 minutos. Os quadrados da análise são transferidos para um frasco de cintilação, 5 ml de coquetel de cintilação são adicionados e a incorporação de ^{32}P (cpm) ao substrato de peptídeo é quantificado com um contador de cintilação Beckman. A porcentagem de inibição é calculada para cada reação.

20 Os compostos da Fórmula I, em forma livre ou em forma de sal farmacologicamente aceitável, apresentam propriedades farmacológicas valiosas, por exemplo, conforme indicado pelos testes *in vitro* descritos neste pedido. Por exemplo, os compostos da Fórmula I mostram, de preferência, um IC_{50} na faixa de 1×10^{-10} a 1×10^{-5} M, de preferência, menos que 50 nM, 250 nM, 100 nM e 50 nM para BCR-Abl tipo selvagem e G250E, E255V, 25 T315I, F317L e M351T BCR-Abl mutantes. Os compostos da Fórmula I, em uma concentração de 10 μ M, de preferência, mostra uma porcentagem de inibição de mais de 50%, de preferência, maior que cerca de 70%, contra Abl, Bcr-Abl, Aurora-A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, 30 IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Sik, Tie2 e TrkB quinases.

Deve-se entender que os exemplos e modalidades descritos aqui servem apenas para propósito ilustrativo e que diversas modificações ou alterações destes serão sugeridas pelos versados na técnica e devem ser incluídas dentro do espírito e limite deste pedido e escopo das reivindicações em anexo. Todas as publicações, patentes, e pedidos de patente citados aqui estão incorporados por meio deste a guisa de referência para todos os propósitos.

REIVINDICAÇÕES

1. Composto da Fórmula I:



onde:

Y é selecionado entre N e CH;

5 R₁ é selecionado entre hidrogênio e C₁₋₆alquila;

R₂ é selecionado entre hidrogênio e C₁₋₆alquila; ou R₁ e R₂, juntamente com o anel fenila ao qual R₁ e R₂ estão ligados formam C₁₋₆arila ou C₅₋₁₀heteroarila;

R₃ é selecionado entre NR₄R₅ e X₁R₅; em que X₁ é selecionado entre uma ligação e C₁₋₄alquilenos; R₄ é selecionado entre hidrogênio e C₁₋₆alquila; R₅ é selecionado entre C₆₋₁₀arila, opcionalmente substituído por 1 a 3 radicais independentemente selecionados entre halo-C₁₋₆alquila substituída, C₁₋₆-alcóxi, C₅₋₁₀heteroaril-C₁₋₄alquila e C₃₋₈heterocicloalquil-C₀₋₄alquila; em que os ditos substituintes de heteroarila e heterocicloalquila de R₅ são opcionalmente substituídos por C₁₋₆-alquila; e os sais, hidratos, solvatos e isômeros farmacologicamente aceitáveis isômeros dos mesmos.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, em que ambos R₁ e R₂ são hidrogênio ou R₁ e R₂, juntamente com o anel fenila ao qual R₁ e R₂ estão ligados formam quinolinila ou naftalenila.

20 3. Composto, de acordo com a reivindicação 2, em que R₃ é selecionado entre NHR₅ e X₁R₅;

em que X₁ é selecionado a partir de uma ligação e metileno; R₅ é selecionado entre fenila opcionalmente substituída por 1 a 3 radicais independentemente selecionados entre trifluór-metila, metóxi, imidazolila e piperazinil-metila; em que os ditos substituintes de imidazolila ou piperazinila de R₅ são opcionalmente substituídos por metila e etila.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, selecionado entre: 1-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-3-(3-trifluorometil-fenil)-uréia; 1-[4-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-3-trifluorometil-fenil]-3-[4-(7H-pirrolo [2,3-d]pi-

rimidin-4-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[3-(4-Metil-imidazol-1-il)-5-trifluorometil-fenil]-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-(3,5-Dimetóxi-fenil)-3-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[4-(9H-Purin-6-ilóxi)-fenil]-3-(3-trifluorometil-fenil)-uréia; 1-[3-(4-Metil-imidazol-1-il)-5-trifluorometil-fenil]-3-[4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[4-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-3-trifluorometil-fenil]-3-[4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-uréia; 1-[5-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-quinolin-8-il]-3-(3-trifluorometil-fenil)-uréia; N-[4-(7H-Pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-2-(3-trifluorometil-fenil)-acetamida; 2-[3-(4-Metil-imidazol-1-il)-5-trifluorometil-fenil]-N-[4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-acetamida; N-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-3-trifluorometil-benzamida; 3-(4-Metil-imidazol-1-il)-N-[4-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-ilóxi)-fenil]-5-trifluorometil-benzamida; N-[4-(9H-Purin-6-ilóxi)-fenil]-3-trifluorometil-benzamida; 4-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-N-[4-(9H-purin-6-ilóxi)-fenil]-3-trifluorometil-benzamida; e N-[5-(9H-Purin-6-ilóxi)-quinolin-8-il]-3-trifluorometil-benzamida.

15 5. Composição farmacêutica, que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto, como definido na reivindicação 1, em combinação com um excipiente farmacêuticamente aceitável.

20 6. Método para tratar uma doença em um animal em que a inibição de atividade de quinase pode prevenir, inibir ou melhorar a patologia e/ou sintomatologia da doença, tal método compreende administrar no animal uma quantidade terapeuticamente eficaz de um composto, como definido na reivindicação 1.

25 7. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que a quinase é selecionada entre Abl, Bcr-Abl, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Syk, Tie2 e TrkB.

30 8. Uso de um composto como definido na reivindicação 1, na fabricação de um medicamento para tratar uma doença em um animal onde a atividade de quinase de Abl, Bcr-Abl, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR, JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II, Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3, SAPK4, Syk, Tie2 e TrkB contribui para a patologia e/ou sintomatologia da doença.

RESUMO

Patente de Invenção: "**COMPOSTOS E COMPOSIÇÕES COMO INIBIDORES DA PROTEÍNA QUINASE**".

A presente invenção refere-se a uma nova classe de compostos,
5 composições farmacêuticas que compreendem tais compostos e métodos
para se utilizar tais compostos para tratar ou prevenir doenças ou distúrbios
associados com a atividade de quinase anormal ou desregulada, particular-
mente doenças ou distúrbios que envolvem ativação anormal das Abl, Bcr-
Abl, Aurora- A, Axl, BMX, CHK2, c-RAF, cSRC, Fes, FGFR3, Flt3, IKK α , IR,
10 JNK2 α 2, Lck, Met, MKK6, MST2, p70S6K, PDGFR α , PKA, PKD2, ROCK-II,
Ros, Rsk1, SAPK2 α , SAPK2 β , SAPK3 SAPK4, Syk, Tie2 e TrkB quinases.