



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) BR 112016010080-8 B1**



\* B R 1 1 2 0 1 6 0 1 0 0 8 0 B 1 \*

**(22) Data do Depósito: 14/11/2014**

**(45) Data de Concessão: 29/12/2020**

**(54) Título:** COMPOSTOS DE PIRAZOLOPIRIMIDINA, COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA E SEU USO

**(51) Int.Cl.:** C07D 487/04; A61K 31/519; A61P 35/00.

**(30) Prioridade Unionista:** 15/11/2013 CA PCT/CA2013/000957.

**(73) Titular(es):** UNIVERSITY HEALTH NETWORK.

**(72) Inventor(es):** RADOSLAW LAUFER; GRACE NG; SZE-WAN LI; HEINZ W. PAULS; YONG LIU; NARENDRA KUMAR B. PATEL.

**(86) Pedido PCT:** PCT CA2014051091 de 14/11/2014

**(87) Publicação PCT:** WO 2015/070349 de 21/05/2015

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 04/05/2016

**(57) Resumo:** COMPOSTOS DE PIRAZOLOPIRIMIDINA. A presente invenção refere-se a um composto representado pela seguinte fórmula estrutural: (I); ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. A presente invenção também se refere a composições farmacêuticas e a métodos de utilização das mesmas.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para  
**"COMPOSTOS DE PIRAZOLOPIRIMIDINA, COMPOSIÇÃO  
FARMACÊUTICA E SEU USO".**

**PEDIDOS RELACIONADOS**

[0001] Este pedido reivindica o benefício do Pedido de Patente Internacional No. PCT/CA2013/000957, depositado em 15 de novembro de 2013. Todos os ensinamentos do pedido supracitado são incorporados aqui, a este pedido de patente, por meio de referência.

**ANTECEDENTES DA INVENÇÃO**

[0002] As proteína quinases têm sido a matéria de extensivo estudo na pesquisa de novos agentes terapêuticos em várias doenças, por exemplo, câncer. Sabe-se que as proteína quinases mediam a transdução de sinal intracelular efetuando uma transferência de fosforila a partir de um nucleosídeo trifosfato para um aceitador de proteína que está envolvido em um caminho de sinalização. Existem uma série de quinases e caminhos através dos quais estímulos extracelulares e diversos fazem que uma variedade de respostas celulares ocorram dentro da célula.

[0003] A proteína quinase TTK humana (TTK), também conhecida como tirosina treonina quinase, proteína quinase de dupla especificidade TTK, Fuso Monopolar (Mps1, *Monopolar Spindle 1*) e Treonina Quinase Fosfotirosina-Picked (PYT, *Phosphotyrosine-Picked Threonine Kinase*), é uma quinase multiespecífica conservada que é capaz de fosforilação de resíduos serina, treonina e tirosina quando expressada em *E. coli* (Mills et al., *J. Biol. Chem.* 22(5): 16000-16006 (1992)). O mRNA da TTK não é expressado na maioria dos tecidos fisiologicamente normais em seres humanos (*Id*). O mRNA da TTK é expressado em alguns tecidos rapidamente proliferantes, tais como testiculose timo, bem como em alguns tumores (por exemplo, o mRNA de TTK não foi expressado em carcinoma de células renais, foi

expressado em 50% de amostras de câncer de mama, foi expressado em amostras de tumores testiculares e em amostras de câncer ovariano) (*Id.*). A TTK é expressada em algumas linhagens de células cancerígenas e tumores em relação às contrapartes normais (*Id.*; vide também o Pedido de Patente Internacional No. WO 02/068444 A1).

[0004] Portanto, agentes os quais inibem uma proteína quinase, em particular TTK, têm o potencial de tratar o câncer. Existe uma necessidade de agentes adicionais os quais podem agir como inibidores da proteína quinase, em particular inibidores de TTK.

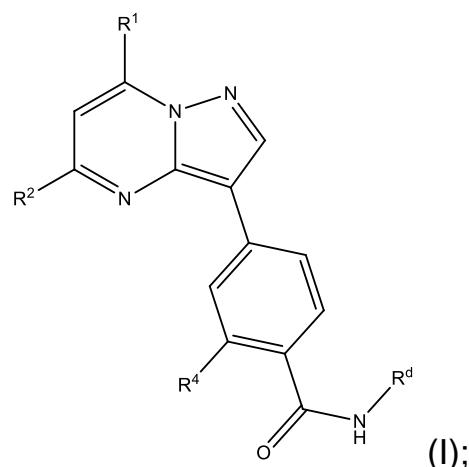
[0005] Além disso, recidiva do câncer, resistência a fármaco ou metástase é um dos principais desafios em terapias contra o câncer. Pacientes com câncer os quais responderam favoravelmente à terapia anticancerígena inicial frequentemente desenvolvem resistência a fármaco e tumores secundários que levam à recidiva da doença. Evidências de pesquisas recentes sugerem que a capacidade de um tumor para crescer e propagar é dependente de um pequeno subgrupo de células dentro do tumor. Estas células são denominadas células de iniciação tumoral (TICs) ou células-tronco cancerígenas. Imagina-se que as TICs sejam responsáveis por resistência a fármaco, recidiva de câncer e metástase. Compostos que podem inibir o crescimento e a sobrevida destas células de iniciação tumoral podem ser usados para tratar câncer, metástase ou prevenir recidiva de câncer. Portanto, existe uma necessidade de novos compostos que possam inibir o crescimento e a sobrevida de células de iniciação tumoral.

## SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[0006] As requerentes descobriram agora que alguns compostos de pirazolopirimidina são potentes inibidores de quinases, tais como a proteína quinase TTK (vide o Exemplo B). As requerentes também descobriram que estes compostos têm potente atividade anticancerígena contra células de câncer de mama, câncer de cólon, e

câncer ovariano em estudo de cultura celular (vide os Exemplos C a D). Com base nestas descobertas, compostos de pirazolopirimidina, composições farmacêuticas dos mesmos, e métodos de tratamento do câncer com os compostos de pirazolopirimidina são revelados aqui, neste pedido de patente.

[0007] Os presentes ensinamentos se referem, no mínimo em parte, a um composto representado pela seguinte fórmula estrutural:



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

$\text{R}^1$  é  $-\text{NH}-\text{CH}_2\text{-Cy}$ ,

Cy é  $\text{C}_3\text{-C}_4$  cicloalquila opcionalmente substituída com um ou dois grupos selecionados entre alquila e hidroxila;

$\text{R}^2$  é -O-piridinila;  $-\text{NH}-(\text{C}_2\text{-C}_6)$ hidroxialquila opcionalmente substituída com ciclopropila ou isopropila; ou  $-\text{NH}-(\text{C}_3\text{-C}_6)$ cicloalquila opcionalmente substituída com hidroxila ou  $(\text{C}_1\text{-C}_2)$ hidroxilalquila;

$\text{R}^4$  é selecionado entre hidrogênio, halogênio, e  $(\text{C}_1\text{-C}_3)$ alquila; e

$\text{R}^d$  é ciclopropila. De modo preferencial,  $\text{R}^4$  é cloro ou metila.

[0008] Em uma modalidade, os presentes ensinamentos incluem uma composição farmacêutica compreendendo um veículo ou diluente farmaceuticamente aceitável e um composto representado pela Fórmula Estrutural (I) descrito acima ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[0009] Em outra modalidade, os presentes ensinamentos proporcionam um método de tratamento de um sujeito que tem câncer compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um composto de fórmula estrutural (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00010] Outra modalidade dos presentes ensinamentos proporciona um método de inibição da atividade da TTK em um sujeito que necessite de inibição da atividade da TTK, compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00011] Outra modalidade dos presentes ensinamentos inclui a utilização de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em terapia. Em algumas modalidades, a terapia é para tratamento de um sujeito com câncer. Alternativamente, a terapia é para inibição da atividade da TTK em um sujeito que necessite de inibição da atividade da TTK.

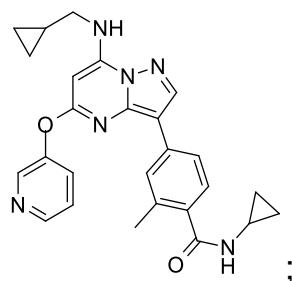
[00012] Outra modalidade dos presentes ensinamentos inclui a utilização de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para a fabricação de um medicamento para tratamento de um sujeito com câncer.

[00013] Outra modalidade dos presentes ensinamentos inclui a utilização de um composto representado pelas Fórmulas Estruturais (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para a fabricação de um medicamento para inibição da atividade da TTK em um sujeito que necessite de inibição da atividade da TTK.

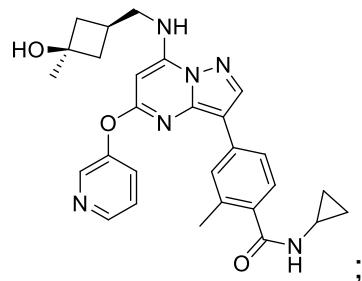
#### DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[00014] Em uma modalidade, os presentes ensinamentos se referem a um composto representado pela Fórmula Estrutural (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. A invenção também inclui os compostos representados por estrutura e/ou descritos por nome na

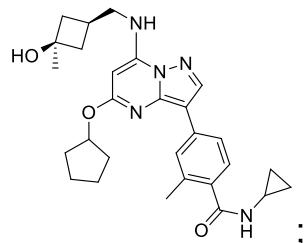
Exemplificação, e inclui tanto as formas neutras bem como sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos. Tratamentos com e/ou utilizações destes compostos (incluindo formas neutras e sais farmaceuticamente aceitáveis dos mesmos) conforme descrito aqui, neste pedido de patente, também estão incluídos na invenção. Exemplos específicos de compostos da invenção são mostrados abaixo:



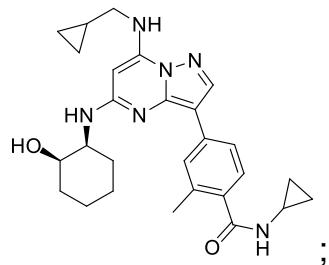
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo; e



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00015] O termo "alquil" usado isolado ou como parte de uma porção maior, tal como "hidroxialquila", e semelhantes, significa radical hidrocarboneto monovalente saturado alifático de cadeia reta ou ramificado. A menos que especificado de modo diverso, um grupo alquila tipicamente tem 1 a 6 átomos de carbono, isto é, (C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquila . Conforme usado aqui, neste pedido de patente, um grupo "(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)alquila" significa um radical tendo de 1 a 6 átomos de carbono em uma disposição linear ou ramificada.

[00016] "Cicloalquila" significa um radical hidrocarboneto saturado alifático cílico opcionalmente contendo uma ou mais ligações duplas. Pode ser monocíclico, bicíclico (por exemplo, um anel bicíclico com ponte), policíclico (por exemplo, tricíclico), ou fundido. Por exemplo, (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)cicloalquila monocíclica significa um radical tendo de 3 a 7 átomos de carbono arranjados em um anel monocíclico. Uma (C<sub>3</sub>-C<sub>7</sub>)cicloalquila inclui, mas não está limitada a, ciclopropila, ciclobutila, ciclopentila, ciclo-hexila, e ciclo-heptila.

[00017] Alguns dos compostos descritos aqui, neste pedido de patente, podem existir em várias formas estereoisoméricas ou tautoméricas. Estereoisômeros são compostos os quais diferem somente em sua disposição espacial. Quando um composto revelado é denominado ou representado pela estrutura sem indicar a estereoquímica, entende-se que o nome ou a estrutura engloba todos os possíveis estereoisômeros, tautômeros, isômeros geométricos ou uma combinação dos mesmos.

[00018] Quando um isômero geométrico é representado pelo nome ou pela estrutura, deve ser entendido que a pureza isomérica geométrica do isômero geométrico denominado ou representado é no mínimo 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 99,9% pura em peso. A pureza isomérica geométrica é determinada dividindo o peso do isômero geométrico denominado ou representado na mistura pelo peso total de

todos os isômeros geométricos na mistura.

[00019] Mistura racêmica significa 50% de um enantiômero e 50% de seu enantiômero correspondente. Os presentes ensinamentos englobam todas as misturas enantiomericamente puras, enantiomericamente enriquecidas, diastereomericamente puras, diastereomericamente enriquecidas, e racêmicas, e misturas diastereoméricas dos compostos descritos aqui, neste pedido de patente.

[00020] Misturas enantioméricas e diastereoméricas podem ser resolvidas em seus componentes enantiômeros ou estereoisômeros por métodos de conhecimento geral, tais como cromatografia gasosa de fase quiral, cromatografia líquida de alta performance de fase quiral, cristalização do composto como um complexo salino quiral, ou cristalização do composto em um solvente quiral. Enantiômeros e diastereômeros também podem ser obtidos a partir de intermediários, reagentes, e catalisadores diastereomericamente ou enantiomericamente puros por métodos sintéticos assimétricos de conhecimento geral.

[00021] Quando um composto é designado por um nome ou uma estrutura que indica um único enantiômero, a menos que indicado de modo diverso, o composto é no mínimo 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 99,9% oticamente puro (também referido como "enantiomericamente puro"). Pureza ótica é o peso na mistura do enantiômero denominado ou representado dividido pelo peso total na mistura de ambos os enantiômeros.

[00022] Quando a estereoquímica de um composto revelado é denominada ou representada por estrutura, e a estrutura denominada ou representada engloba mais de um estereoisômero (por exemplo, como em um par diastereomérico), deve ser entendido que os estereoisômeros englobados ou qualquer mistura dos estereoisômeros

englobados são incluídos. Deve ser adicionalmente entendido que a pureza estereoisomérica dos estereoisômeros denominados ou representados é de no mínimo 60%, 70%, 80%, 90%, 99% ou 99,9% em peso. A pureza estereoisomérica neste caso é determinada dividindo o peso total na mistura dos estereoisômeros, englobados pelo nome ou pela estrutura, pelo peso total na mistura de todos os estereoisômeros.

[00023] Incluídos nos presentes ensinamentos estão sais farmaceuticamente aceitáveis dos compostos revelados aqui, neste pedido de patente. Os compostos revelados têm grupos amina básicos e portanto podem formar sais farmaceuticamente aceitáveis com um ou mais ácidos farmaceuticamente aceitáveis. Sais de adição de ácido farmaceuticamente aceitáveis dos compostos descritos aqui, neste pedido de patente, incluem sais de ácidos inorgânicos (tais como ácido clorídrico, ácidos bromídrico, fosfórico, nítrico, e sulfúrico) e de ácidos orgânicos (tais como, ácido acético, ácidos benzenossulfônico, benzoico, metanossulfônico, e p-toluenossulfônico). Compostos dos presentes ensinamentos com grupos acidíferos tais como ácidos carboxílicos podem formar sais farmaceuticamente aceitáveis com uma ou mais bases farmaceuticamente aceitáveis. Sais básicos farmaceuticamente aceitáveis incluem sais de amônio, sais de metais de álcali (tais como sais de sódio e de potássio) e sais de metais alcalinoterrosos (tais como sais de magnésio e de cálcio). Compostos com um grupo amônio quaternário também contêm um contra-ânion tal como cloreto, brometo, iodeto, acetato, perclorato e semelhantes. Outros exemplos de semelhantes sais incluem cloridratos, bromidratos, sulfatos, metanossulfonatos, nitratos, benzoatos e sais com aminoácidos tais como ácido glutâmico.

[00024] Compostos descritos aqui, neste pedido de patente, podem inibir várias quinases, incluindo a TTK. Portanto, de modo geral, os

compostos descritos aqui, neste pedido de patente, são úteis no tratamento de doenças ou condições associadas com as quinases referidas. Em algumas modalidades, os compostos descritos aqui, neste pedido de patente, podem inibir TTK.

[00025] Em uma modalidade, os compostos descritos aqui, neste pedido de patente, são inibidores de TTK, e são úteis para tratamento de doenças, tais como câncer, associadas com a uma ou mais quinases referidas.

[00026] Outro aspecto dos presentes ensinamentos se refere a um método de tratamento de um sujeito com câncer compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um composto descrito aqui, neste pedido de patente. Em uma modalidade, os compostos descritos aqui, neste pedido de patente, inibem o crescimento de um tumor. Por exemplo, os compostos descritos aqui, neste pedido de patente, inibem o crescimento de um tumor que superexpressa TTK.

[00027] Cânceres que podem ser tratados (incluindo redução na probabilidade de recidiva) por meio dos métodos dos presentes ensinamentos incluem câncer pulmonar, câncer de mama, câncer de cólon, câncer cerebral, neuroblastoma, câncer de próstata, melanoma, glioblastoma multiforme, câncer ovariano, linfoma, leucemia, melanoma, sarcoma, paraneoplasia, osteossarcoma, germinoma, glioma e mesotelioma. Em uma modalidade, o câncer é selecionado entre leucemia, leucemia mieloide aguda, leucemia mielogênica crônica, câncer de mama, câncer cerebral, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de cabeça e pescoço, carcinoma hepatocelular, adenocarcinoma pulmonar, melanoma metastático, câncer pancreático, câncer de próstata, câncer ovariano e câncer renal. Em uma modalidade, o câncer é câncer pulmonar, câncer de cólon, câncer cerebral, neuroblastoma, câncer de próstata, melanoma, glioblastoma multiforme ou câncer ovariano. Em outra modalidade, o câncer é câncer

pancreático, câncer de próstata, câncer pulmonar, melanoma, câncer de mama, câncer de cólon, ou câncer ovariano. Em ainda outra modalidade, o câncer é câncer de mama, câncer de cólon e câncer ovariano. Em ainda outra modalidade, o câncer é um câncer de mama. Em ainda outra modalidade, o câncer é um câncer de mama de subtipo basal ou um câncer de mama de subtipo luminal B. Em ainda outra modalidade, o câncer é um câncer de mama de subtipo basal que superexpressa TTK. Em ainda outra modalidade, o câncer de mama de subtipo basal é ER (receptor de estrogênio), câncer de mama HER2 e PR negativo (receptor de progesterona). Em ainda outra modalidade, o câncer é um câncer de tecidos moles. Um "câncer de tecidos moles" é um termo reconhecido na técnica que engloba tumores derivados de qualquer tecido mole do corpo. O tecido mole referido conecta, suporta, ou circunda várias estruturas e órgãos do corpo, incluindo, mas não limitados a, músculo liso, músculo esquelético, tendões, tecidos fibrosos, tecido gorduroso, vasos sanguíneos e linfáticos, tecido perivascular, nervos, células mesenquimais e tecidos sinoviais. Portanto, cânceres de tecidos moles podem ser de tecido gorduroso, tecido muscular, tecido nervoso, tecido articular, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, e tecidos fibrosos. Os cânceres de tecidos moles podem ser benignos ou malignos. De modo geral, cânceres malignos de tecidos moles são referidos como sarcomas, ou sarcomas de tecidos moles. Existem muitos tipos de tumores de tecidos moles, incluindo lipoma, lipoblastoma, hibernoma, lipossarcoma, leiomioma, leiomiossarcoma, rabdomioma, rabdomiossarcoma, neurofibroma, schwanoma (neurilemoma), neuroma, schwanoma maligno, neurofibrossarcoma, sarcoma neurogênico, tenossinovite nodular, sarcoma sinovial, hemangioma, tumor glônico, hemangiopericitoma, hemangioendotelioma, angiossarcoma, sarcoma de Kaposi, linfangioma, fibroma, elastofibroma, fibromatose superficial, histiocitoma

fibroso, fibrossarcoma, fibromatose, dermatofibrossarcoma protuberante (DFSP), histiocitoma fibroso maligno (MFH), mixoma, tumor de células granulares, mesenquimomas malignos, sarcoma de partes moles alveolar, sarcoma epitelioide, sarcoma de células claras, e tumor de células pequenas desmoplásico. Em uma modalidade particular, o câncer de tecidos moles é um sarcoma selecionado entre o grupo consistindo em um fibrossarcoma, um sarcoma gastrointestinal, um leiomiossarcoma, um lipossarcoma desdiferenciado, um lipossarcoma pleomórfico, um histiocitoma fibroso maligno, um sarcoma de células redondas, e um sarcoma sinovial.

[00028] Em algumas modalidades, os presentes ensinamentos proporcionam métodos de inibição do crescimento de células de iniciação tumoral ou de redução da probabilidade de recidiva de um câncer em um sujeito que está sendo submetido a uma terapia anticancerígena. O método compreende as etapas de:

a) avaliação do sujeito para determinar se o câncer está em remissão; e

b) se o câncer estiver em remissão; então administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um inibidor de TTK (por exemplo, um composto representado pela Fórmula Estrutural (I)). Se o câncer não estiver em remissão, o método opcionalmente compreende adicionalmente a etapa de continuar a terapia anticancerígena até o câncer estar em remissão e em seguida a etapa b) de administrar uma quantidade eficaz de um inibidor de TTK (por exemplo, um composto representado pela Fórmula Estrutural (I)).

[00029] Conforme usado aqui, neste pedido de patente, o termo "células de iniciação tumoral" ou "TICs" se refere a células presentes dentro de alguns tumores que possuem a capacidade de autorrenovar e proliferar. Estas células são algumas vezes denominadas células-tronco cancerígenas (CSCs) e pode ser observado que compartilham

determinadas características com células-tronco normais, incluindo um fenótipo e função semelhante a células-tronco. Em algumas modalidades, TICs são caracterizadas por sua capacidade para formar tumores depois de xenotransplantação em camundongos imunodeficientes.

[00030] Em algumas modalidades, os presentes ensinamentos proporcionam métodos de inibição do crescimento de células de iniciação tumoral ou redução da probabilidade de recidiva de um câncer em um sujeito cujo câncer está em remissão compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um inibidor de TTK (por exemplo, um composto representado pela Fórmula Estrutural (I)).

[00031] Em algumas modalidades, por exemplo, onde o sujeito está sendo tratado para reduzir a probabilidade de recidiva de um câncer, o sujeito já foi tratado com uma terapia anticancerígena. Alternativamente, o sujeito já foi tratado com uma terapia anticancerígena e o sujeito está em remissão.

[00032] Em algumas modalidades, os presentes ensinamentos proporcionam métodos de tratamento de um sujeito com um câncer compreendendo administrar ao sujeito uma quantidade eficaz de um composto representado pela Fórmula Estrutural (I) em combinação com uma terapia anticancerígena eficaz. Em uma modalidade, o câncer é um câncer metastático. Um "câncer metastático" é um câncer que se disseminou a partir de seu sítio primário para outras partes do corpo.

[00033] Em outra modalidade, os presentes ensinamentos se referem a um método de tratamento de um sujeito com um câncer resistente a fármaco. Um "câncer resistente a fármaco" é um câncer que não é responsivo a um, dois, três, quatro, cinco ou mais fármacos que são tipicamente usados para o tratamento do câncer. Em uma modalidade, o câncer resistente a fármaco é mediado pelo crescimento de células de iniciação tumoral.

[00034] Métodos adequados conhecidos na técnica podem ser usados para avaliar um sujeito para determinar se o câncer está em remissão. Por exemplo, o tamanho do tumor e/ou marcadores tumorais, proteínas geralmente associadas com tumores, podem ser monitorados para determinar o estado do câncer. O tamanho do tumor pode ser monitorado com dispositivos de imagiologia, tais como raios X, MRI, CAT scans, ultrassom, mamografia, PET e semelhantes ou através de biópsia.

[00035] Para os métodos descritos aqui, neste pedido de patente, por exemplo, métodos de coadministração, a terapia anticancerígena são selecionados entre o grupo consistindo em cirurgia, terapia de radiação, imunoterapia, terapia endócrina, terapia genética e administração de um agente anticancerígeno. Alternativamente, a terapia anticancerígena é terapia de radiação. Em outra alternativa, a terapia anticancerígena é imunoterapia. Em outra alternativa, a terapia anticancerígena é administração de um agente anticancerígeno. Em ainda outra alternativa, a terapia anticancerígena é cirurgia.

[00036] Terapia por radiação é a utilização de radiação para matar, destruir ou tratar os cânceres. Exemplo de terapia por radiação inclui, mas não está limitado a, radiação gama, radioterapia de feixes de nêutrons, radioterapia de feixes de elétrons, terapia de prótons, braquiterapia, e terapia de radioisótopos (isto é, terapia sistêmica de isótopos radioativos),

[00037] Uma terapia endócrina é um tratamento que adiciona, bloqueia ou remove hormônios. Por exemplo, agentes quimioterápicos que podem bloquear a produção ou a atividade de estrogênios têm sido usados para o tratamento do câncer de mama. Além disso, estimulação hormonal do sistema imune tem sido usada para tratar cânceres específicos, tais como carcinoma de células renais e melanoma. Em uma modalidade, a terapia endócrina compreende a administração de

hormônios naturais, hormônios sintéticos ou outras moléculas sintéticas que podem bloquear ou aumentar a produção dos hormônios naturais do corpo. Em outra modalidade, a terapia endócrina inclui a remoção de uma glândula que produz um determinado hormônio.

[00038] Conforme usado aqui, neste pedido de patente, uma terapia genética é a inserção de genes em uma célula e tecidos biológicos de um sujeito ou para tratar doenças, tais como câncer. Exemplo de terapia genética inclui, mas não está limitado a, uma terapia com gene da linhagem germinativa e uma terapia genética somática.

[00039] Imunoterapia (também denominada terapia modificadora da resposta, terapia biológica, bioterapia, imunoterapia, ou terapia biológica) é tratamento que usa partes do sistema imune para combater doença. Imunoterapia pode ajudar o sistema imune a reconhecer células cancerígenas, ou reforçar uma resposta contra células cancerígenas. Imunoterapias incluem imunoterapias ativas e passivas. Imunoterapias ativas estimulam o sistema imune do próprio corpo ao passo que imunoterapias passivas geralmente usam componentes do sistema imune criados fora do corpo.

[00040] Exemplos de imunoterapias ativas incluem, mas não estão limitados a vacinas incluindo vacinas de câncer, vacinas de células tumorais (autólogas ou alógênicas), vacinas de células dendríticas, vacinas de抗ígenos, vacinas anti-idiotípico, vacinas de DNA, vacinas virais, ou Vacina de Linfócitos de Infiltração Tumoral (TIL) com Interleucina-2 (IL-2) ou Terapia de Células Killer Ativadas por Linfocina (LAK).

[00041] Exemplos de imunoterapias passivas incluem, mas não estão limitados a anticorpos monoclonais e terapias direcionais contendo toxinas. Anticorpos monoclonais incluem anticorpos naked e anticorpos monoclonais conjugados (também denominados anticorpos etiquetados, marcados, ou carregados). Anticorpos monoclonais naked

não têm um fármaco ou material radioativo anexado ao passo que anticorpos monoclonais conjugados são conjugados a, por exemplo, um fármaco quimioterápico (quimiomarcado), uma partícula radioativa (radiomarcada), ou uma toxina (imunotoxina). Exemplos destes fármacos de anticorpos monoclonais naked incluem, mas não estão limitados a Rituximab (Rituxan), um anticorpo contra o antígeno CD20 usado para tratar, por exemplo, linfoma não-Hodgkin de células B; Trastuzumab (Herceptin), um anticorpo contra a proteína HER2 usado para tratar, por exemplo, câncer de mama avançado; Alemtuzumab (Campath), um anticorpo contra o antígeno CD52 usado para tratar, por exemplo, leucemia linfocítica crônica de células B (B-CLL); Cetuximab (Erbitux), um anticorpo contra a proteína EGFR usado, por exemplo, em combinação com irinotecano para tratar, por exemplo, câncer colorretal avançado e cânceres de cabeça e pescoço; e Bevacizumab (Avastin) o qual é uma terapia antiangiogênese que funciona contra a proteína VEGF e é usado, por exemplo, e combinação com quimioterapia para tratar, por exemplo, câncer colorretal metastático. Exemplos dos anticorpos monoclonais conjugados incluem, mas não estão limitados a anticorpo radiomarcado Ibritumomab tiuxetan (Zevalin) o qual libera radioatividade diretamente para os linfócitos B cancerosos e é usado para tratar, por exemplo, linfoma não-Hodgkin de células B; anticorpo radiomarcado Tositumomab (Bexxar) o qual é usado para tratar, por exemplo, alguns tipos de linfoma não-Hodgkin; e imunotoxina Gemtuzumab ozogamicina (Mylotarg) a qual contém caliqueamicina e é usada para tratar, por exemplo, leucemia mielogênica aguda (AML). BL22 é um anticorpo monoclonal conjugado para tratamento de, por exemplo, leucemia de células cabeludas, imunotoxinas para tratamento de, por exemplo, leucemias, linfomas, e tumores cerebrais, e anticorpos radiomarcados tais como OncoScint por exemplo, para cânceres colorretais e ovarianos e ProstaScint por exemplo, para cânceres de

próstata.

[00042] Exemplos adicionais de anticorpos terapêuticos que podem ser usados incluem, mas não estão limitados a, HERCEPTIN® (Trastuzumab) (Genentech, CA) o qual é um anticorpo monoclonal anti-HER2 humanizado para o tratamento de pacientes com câncer de mama metastático; REOPRO® (abciximab) (Centocor) o qual é um receptor antiglicoproteína IIb/IIIa sobre as plaquetas para a prevenção da formação de coágulo; ZENAPAX® (daclizumab) (Roche Pharmaceuticals, Suíça) o qual é um anticorpo monoclonal anti-CD25 humanizado imunossupressor, para a prevenção de rejeição de aloenxerto renal aguda; PANOREX™ o qual é um anticorpo IgG2a anti-17-IA antígeno superficial celular murino (Glaxo Wellcome/Centocor); BEC2 o qual é um anticorpo IgG anti-idiotípico murino (GD3 epitope) (ImClone System); IMC-C225 o qual é um anticorpo IgG anti-EGFR quimérico (ImClone System); VITAXIN™ o qual é um anticorpo anti-integrina αVβ3 humanizado (Applied Molecular Evolution/MedImmune); Campath 1H/LDP-03 o qual é um anticorpo IgG1 anti-CD52 humanizado (Leukosite); Smart M195 o qual é um anticorpo IgG anti-CD33 humanizado (Protein Design Lab/Kanebo); RITUXAN™ o qual é um anticorpo IgG1 anti-CD20 quimérico (IDEC Pharm/Genentech, Roche/Zettyaku); LYMPHOCIDE™ o qual é um anticorpo IgG anti-CD22 humanizado (Immunomedics); LYMPHOCIDE™ Y-90 (Immunomedics); Lymphoscan (marcado com Tc-99m; radioimaging; Immunomedics); Nuvion (contra CD3; Protein Design Labs); CM3 é um anticorpo anti-ICAM3 humanizado (ICOS Pharm); IDEC-114 é um anticorpo anti-CD80 primatizado (IDEC Pharm/Mitsubishi); ZEVALIN™ é um anticorpo radiolabelled murine anti-CD20 anticorpo (IDEC/Schering AG); IDEC-131 é um anticorpo anti-CD40L humanizado (IDEC/Eisai); IDEC-151 é um anticorpo anti-CD4 primatizado (IDEC); IDEC-152 é um anticorpo anti-CD23 primatizado (IDEC/Seikagaku); SMART anti-CD3 é um

anticorpo IgG anti-CD3 humanizado (Protein Design Lab); 5G1.1 é um anticorpo antifator de complemento 5 (C5) humanizado (Alexion Pharm); D2E7 é um anticorpo anti-TNF- $\alpha$  humanizado (CAT/BASF); CDP870 é um anticorpo de fragmento Fab anti-TNF- $\alpha$  humanizado (Celltech); IDEC-151 é um anticorpo IgG1 anti-CD4 primatizado (IDEC Pharm/SmithKline Beecham); MDX-CD4 é um anticorpo IgG anti-CD4 humano (Medarex/Eisai/ Genmab); CD20-estreptavidina (+biotina-ítrio 90; NeoRx); CDP571 é um anticorpo IgG4 anti-TNF- $\alpha$  humanizado (Celltech); LDP-02 é um anticorpo anti- $\alpha$ 4 $\beta$ 7 humanizado (LeukoSite/Genentech); OrthoClone OKT4A é um anticorpo IgG anti-CD4 humanizado (Ortho Biotech); ANTOVA™ é um anticorpo humanizado IgG anti-CD40L humanizado (Biogen); ANTEGREN™ é um anticorpo humanizado IgG anti-VLA-4 humanizado (Elan); e CAT-152 é um anticorpo anti-TGF- $\beta$ 2 humano (Cambridge Ab Tech).

[00043] Imunoterapias que podem ser usadas nos presentes ensinamentos incluem imunoterapias adjuvantes. Exemplos incluem citocinas, tais como fator estimulante de colônias de macrófagos granulócitos (GM-CSF), fator estimulante de colônias de granulócitos (G-CSF), proteína inflamatória de macrófagos (MIP)-1-alfa, interleucinas (incluindo IL-1, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, IL-15, IL-18, IL-21, e IL-27), fatores de necrose tumoral (incluindo TNF-alfa), e interferons (incluindo IFN-alfa, IFN-beta, e IFN-gama); hidróxido de alumínio (alúmen); Bacilo Calmette-Guérin (BCG); hemocianina de Keyhole limpet (KLH); adjuvante Incompleto de Freund (IFA); QS-21; DETOX; Levamisol; e Dinitrofenil (DNP), e combinações dos mesmos, tais como, por exemplo, combinações de, interleucinas, por exemplo, IL-2 com outras citocinas, tais como IFN-alfa.

[00044] Alternativamente, a terapia anticancerígena descrita aqui, neste pedido de patente, inclui a administração de um agente anticancerígeno. Um "agente anticancerígeno" é um composto, o qual

quando administrado em uma quantidade eficaz a um sujeito com câncer, pode realizar, parcialmente ou substancialmente, um ou mais dos seguintes: parada do crescimento, redução da extensão de um câncer (por exemplo, redução do tamanho de um tumor), inibição da taxa de crescimento de um câncer, e melhora ou aprimoramento de um sintoma clínico ou indicador associado com um câncer (tais como componentes do soro ou tecido) ou aumento da longevidade do sujeito.

[00045] O agente anticancerígeno adequado para uso nos métodos descritos aqui, neste pedido de patente, inclui quaisquer agentes anticancerígenos que tenham sido aprovados para o tratamento de câncer. Em uma modalidade, o agente anticancerígeno inclui, mas não está limitado a, um anticorpo direcionado, um inibidor da angiogênese, um agente alquilante, um antimetabólito, um vinca alcalóide, um taxano, uma podofilotoxina, um inibidor da topoisomerase, um agente hormonal antineoplásico e outros agentes antineoplásicos.

[00046] Exemplos de agentes alquilantes úteis nos métodos dos presentes ensinamentos incluem, mas não estão limitados a, mostardas de nitrogênio (por exemplo, mecloroetamina, ciclofosfamida, clorambucila, melfalano, etc.), ethylenimine e metilmelaminas (por exemplo, hexametilmelamina, tiotepa), sulfonatos de alquila (por exemplo, bussulfan), nitrosoureas (por exemplo, carmustina, lomusitna, semustina, estreptozocina, etc.), ou triazenos (decarbazina, etc.). Exemplos de antimetabólitos úteis nos métodos dos presentes ensinamentos incluem, mas não estão limitados a análogo do ácido fólico (por exemplo, metotrexato), ou análogos de pirimidina (por exemplo, fluorouracila, floxouridina, Citarabina), análogos de purina (por exemplo, mercaptopurina, tioguanina, pentostatina). Exemplos de alcaloides vegetais e terpenoides ou derivados dos mesmos incluem, mas não estão limitados a, vinca alcaloides (por exemplo, vincristina, vimblastina, vinorelbina, vindesina), podofilotoxina, e taxanos (por

exemplo, paclitaxel, docetaxel). Exemplos de um inibidor da topoisomerase incluem, mas não estão limitados a, irinotecano, topotecano, ansacrina, etoposídeo, etoposídeo fosfato e teniposídeo. Exemplos de agentes antineoplásicos incluem, mas não estão limitados a, actinomicina, antraciclinas (por exemplo, doxorrubicina, daunorrubicina, valrubicina, idarubicina, epirubicina), bleomicina, plicamicina e mitomicina.

[00047] Em uma modalidade, os agentes anticancerígenos que podem ser usados nos presentes ensinamentos incluem Adriamicina, Dactinomicina, Bleomicina, Vimblastina, Cisplatina, acivicina; aclarubicina; hidrocloreto de acodazol; acronina; adozelesina; aldesleucina; altretamina; ambomicina; acetato de ametantrona; aminoglutetimida; ansacrina; anastrozol; antramicina; asparaginase; asperlin; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutamida; hidrocloreto de bisantreno; dimesilato de bisnafida; bizelesina; sulfato de bleomicina; brequinar sódio; bropirimina; busulfan; cactinomicina; calusterona; caracemida; carbetimer; carboplatina; carmustina; hidrocloreto de carubicina; carzelesina; cedefingol; clorambucila; cirolemicina; cladribina; mesilato de crisnatol; ciclofosfamida; citarabina; dacarbazina; hidrocloreto de daunorrubicina; decitabina; dexormaplatina; dezaguanina; mesilato de dezaguanina; diaziquona; doxorrubicina; hidrocloreto de doxorrubicina; droloxifeno; citrato de droloxifeno; propionato de dromostanolona; duazomicina; edatrexato; hidrocloreto de eflornitina; elsamitrucina; enloplatina; empromato; epipropidina; hidrocloreto de epirubicina; erbulozol; hidrocloreto de esorrubicina; estramustina; sódio fosfato de estramustina; etanidazol; etoposídeo; fosfato de etoposídeo; etoprina; hidrocloreto de fadrozol; fazarabina; fenretinida; floxuridina; fosfato de fludarabina; fluorouracila; flurocitabine; fosquidona; fostriecin sódio; gencitabina; hidrocloreto de gencitabina; hidroxiuréia; hidrocloreto de

idarubicina; ifosfamida; ilmofosina; interleucina II (incluindo interleucina II recombinante, ou rIL2), interferon alfa-2a; interferon alfa-2b; interferon alfa-n1 ; interferon alfa-n3; interferon beta-1 a; interferon gama-1 b; iproplatina; hidrocloreto de irinotecano; acetato de lanreotida; letrozol; acetato de leuproldina; hidrocloreto de liarozol; lometrexol sódio; lomustina; hidrocloreto de losoxantrona; masoprocol; maitansina; hidrocloreto de mecloretamina; acetato de megestrol; acetato de melengestrol; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; sódio metotrexato; metoprina; meturedepa; mitindomida; mitocarcina; mitocromina; mitogilina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotane; hidrocloreto de mitoxantrona; ácido micofenólico; nocodazol; nogalamicina; ormaplatina; oxisuran; pegaspargase; peliomicina; pentamustina; sulfato de peplomicina; perfosfamida; pipobroman; pirossulfan; hidrocloreto de piroxantrona; plicamicina; plomestane; porfímero sódio; porfiromicina; prednimustina; hidrocloreto de procarbazina; puromicina; hidrocloreto puromicinade ; pirazofurina; riboprina; rogletimida; safingol; hidrocloreto de safingol; semustina; simtrazene; sódio esparfosato; esparsomicina; hidrocloreto de espirogermânio; espiromustina; espiroplatina; estreptonigrina; estreptozocina; sulofenur; talisomicina; sódio tecogalan; tegafur; hidrocloreto de teloxantrona; temoporfina; teniposídeo; teroxirona; testolactona; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; citrato de toremifeno; acetato de trestolona; fosfato de triciribina; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelin; hidrocloreto de tubulozol; mostarda de uracila; uredepa; vapreotida; verteporfina; sulfato de vimblastina; sulfato de vincristina; vindesina; sulfato de vindesina; sulfato de vinepidina; vinglicinato sulfato; sulfato de vinleurosina; tartarato de vinorelbina; sulfato de vinrosidina; sulfato de vinzolidina; vorozol; zeniplatina; zinostatin; hidrocloreto de zorrubicina.

[00048] Ainda outros agentes anticancerígenos / fármacos que

podem ser usados nos presentes ensinamentos incluem, mas não estão limitados a: 20-epi-1,25 diidroxivitamina D3; 5-etiniluracila; abiraterona; aclarubicina; acifulveno; adecipenol; adozelesina; aldesleucina; antagonistas de ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; ácido aminolevulínico; anrubicina; ansacrina; anagrelida; anastrozol; andrografolida; inibidores de angiogênese; antagonista D; antagonista G; antarelix; proteína-1 morfogenética anti-dorsalização; antiandrogênio, carcinoma prostático; antiestrogênio; antineoplaston; oligonucleotídeos antisenso; glicinato de afidicolina; moduladores genéticos de apoptose; reguladores de apoptose; ácido apurínico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina desaminase; asulacrina; atamestane; atrimustina; axinastatina 1; axinastatina 2; axinastatina 3; azasetron; azatoxina; azatirosina; derivados de bacatina III; balanol; batimastat; antagonistas de BCR/ABL; benzoclorinas; benzoil estaurosporina; derivados de beta lactama; beta-aletina; betaclamicina B; ácido betulínico; inibidor do bFGF; bicalutamida; bisantreno; bisaziridinilespermina; bisnafida; bistrateno A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitano; butionina sulfoximina; calcipotriol; calfostina C; derivados de camptotecina; canaripox IL-2; capecitabina; carboxamida-amino-triazol; carboxiamidotriazol; CaRest M3; CARN 700; inibidor derivado de cartilagem; carzelesina; inibidores da caseína quinase (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetrorelix; *chlorlns*; sulfonamida de cloroquinoxalina; cicaprost; cis-porfirin; cladribina; análogos de clomifeno; clotrimazol; colismicina A; colismicina B; combretastatina A4; análogo da combretastatina; conagenina; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivados da criptoficina A; curacina A; ciclopentantraquinonas; cicloplatam; cipemicina; ocfosfato de citarabina; fator citolítico; citostatina; dacliximab; decitabina; dehidrodidemnina B; deslorelin; dexametasona; dexifosfamida; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquona; didemnina B; didox;

dietilnorespermina; dihidro-5-azacitidina; 9- dioxamicina; difenil spiromustina; docosanol; dolasetron; doxifluridina; droloxiteno; dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina; edrecolomab; eflornitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristerida; análogo da estramustina; agonistas estrogênicos; antagonistas estrogênicos; etanidazol; etoposídeo fosfato; exemestano; fadrozol; fazarabina; fenretinida; filgrastim; finasterida; flavopiridol; flezelastina; fluasterona; fludarabina; hidrocloreto de fluorodaunorunicina; forfenimex; formestano; fostriecina; fotemustina; gadolínio texafirin; nitrato de gálio; galocitabina; ganirelix; inibidores da gelatinase; gencitabina; inibidores de glutationa; hepsulfam; heregulina; bisacetamida de hexametileno; hipericina; ácido ibandrônico; idarubicina; idoxifeno; idramantona; ilmofosina; ilomastat; imidazoacridonas; imiquimod; peptídeos imunoestimulantes; inibidor de receptores do fator do crescimento 1 semelhante à insulina; agonistas de interferon; interferons; interleucinas; iobenguano; iododoxorrubicina; ipomeanol, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazol; isohomohalicondrina B; itasetron; jasplakinolida; cahalalida F; triacetato de lamellarina-N; lanreotida; leinamicina; lenograstim; sulfato de lentinan; leptolstatina; letrozol; fator de inibição de leucemia; leucócito alfa interferon; leuprolida+estrogênio+progesterona; leuprorelina; levamisol; liarozol; análogo de poliamina linear; peptídeo dissacarídeo lipofílico; compostos de platina lipofílicos; lissoclinamida 7; lobaplatina; lombricina; lometrexol; ionidamina; losoxantrona; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; texafirina de lutécio; lisofilina; peptídeos líticos; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprolol; maspina; inibidores de matrilisina; inibidores de metaloproteinase da matriz; menogaril; merbarona; meterelina; metioninase; metoclopramida; inibidor de MIF; mifepristona; miltefosina; mirimostim; RNA de filamento duplo descasado; mitoguazona; mitolactol; análogos de mitomicina; mitonafida; fator de crescimento de

fibroblastos mitotoxina-saporina; mitoxantrona; mofaroteno; molgramostim; anticorpo monoclonal, gonadotrofina coriônica humana; monofosforil lipídeo A+miobacterium parede celular sk; molidamol; inibidor genético de múltipla resistência a fármacos; terapia à base de múltiplo supressor tumor 1; agente de mostarda anticancerígeno; micaperóxido B; extrato da parede celular micobacteriana; miriaporona; N-acetildinalina; benzamidas N-substituídas; nafarelina; nagrestip; naloxone+pentazocina; napavina; nafterpina; nartograstim; nedaplatina; nemorubicina; ácido neridrônico; endopeptidase neutra; nilutamida; nisamicina; moduladores de óxido nítrico; nitróxido antioxidant; nitrulina; O6-benzilguanina; octreotida; ocicenona; oligonucleotídeos; onapristona; ondansetron; ondansetron; oracina; induter de citocinas orais; ormaplatina; osaterona; oxaliplatina; oxaunomicina; palauamina; palmitoilrizoxina; ácido pamidrônico; panaxitriol; panomifeno; parabactina; pazeliptina; pegaspargase; peldesina; sódio polissulfato de pentosan; pentostatina; pentrozol; perflubron; perfosfamida; álcool perilílico; fenazinomicina; fenila cetato; inibidores da fosfatase; picibanil; hidrocloreto de pilocarpina; pirarubicina; piritrexim; placetina A; placetina B; inibidor de ativador do plasminogênio; complexo de platina; compostos de platina; complexo de platina-triamina; porfímero sódio; porfiromicina; prednisona; propil bis-acridona; prostaglandina J2; inibidores do proteassoma; imunomodulador à base de proteína A; inibidor da proteína quinase C; inibidores da proteína quinase C, microalgal; inibidores da proteína tirosina fosfatase; inibidores da purina nucleosídeo fosforilase; purpurinas; pirazoloacridina; conjugado piridoxilado de hemoglobina polioxietileno; raf antagonistas; raltitrexed; ramosetron; inibidores da ras farnesil proteína transferase; inibidores de ras; inibidor de ras-GAP; reteliptina desmetilada; etidronato de rênio Re 186; rizoxina; ribozimas; RII retinamida; rogletimida; roitucina; romurtida; roquinimex; rubiginona B1; ruboxil; safingol; saintopina;

SarCNU; sarcofitol A; sargamostim; miméticos de Sdi 1; semustina; inibidor 1 derivado da senescência; oligonucleotídeos de sentido; inibidores de transdução de sinal; moduladores de transdução de sinal; proteína de ligação de antígeno de cadeia única; sizofiran; sobuzoxano; borocaptato de sódio; fenilacetato de sódio; solverol; proteína de ligação de somatomedina; sonermina; ácido esparfósico; espicamicina D; espiromustina; esplenopentina; espongistatina 1; esqualamina; inibidor de células-tronco; inibidores da divisão de células-tronco; estipiamida; inibidores de estromelisina; sulfinosina; antagonista de peptídeo intestinal vasoativo superativo; suradista; suramina; svainsonina; glicosaminoglicanos sintéticos; talimustina; metiodeto de tamoxifeno; tauromustina; tazaroteno; sódio tecogalan; tegafur; telurapirílio; inibidores da telomerase; temoporfinha; temozolomida; teniposídeo; tetraclorodecaóxido; tetrazomina; taliblastina; tiocoralina; trombopoietina; mimético da trombopoietina; timalfasina; agonista de receptores da timopoietina; timotrinan; hormônio estimulante da tireoide; estanho etil etiopurpurina; tirapazamina; bicloreto de titanoceno; topsentina; toremifeno; fator de células-tronco totipotentes; inibidores de translação; tretinoína; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosterida; inibidores da tirosina quinase; tifostinas; inibidores de UBC; ubenimex; fator inibitório do crescimento derivado do seio urogenital; antagonistas de receptores da uroquinase; vapreotida; variolina B; sistema vetorial, terapia genética de eritrócitos; velaresol; veramina; verdinas; verteporfina; vinorelbina; vinxaltina; vitaxina; vorozol; zanoterona; zeniplatina; zilascorb; e zinostatina estimalâmero. Fármacos anti-cancerígenos adicionais preferenciais são 5-fluorouracila e leucovorin.

[00049] Em uma modalidade, os agentes anticancerígenos que podem ser usados nos métodos descritos aqui, neste pedido de patente, são selecionados entre o grupo consistindo em paclitaxel, docetaxel, 5-

fluorouracila, trastuzumab, lapatinib, bevacizumab, letrozol, goserelina, tamoxifeno, cetuximab, panitumumab, gencitabina, capecitabina, irinotecano, oxaliplatina, carboplatina, cisplatina, doxorrubicina, epirrubicina, ciclofosfamida, metotrexato, vimblastina, vincristina, melfalano e uma combinação dos mesmos.

[00050] Em uma modalidade, o agente anticancerígeno e o composto representado pela Fórmula Estrutural (I) são administrados concomitantemente. Quando administrados concomitantemente, o agente anticancerígeno e o composto podem ser administrados na mesma formulação ou em diferentes formulações. Alternativamente, o composto e o agente anticancerígeno adicional são administrados separadamente. Alternativamente, o composto e o agente anticancerígeno adicional podem ser administrados sequencialmente, como composições separadas, dentro de um frame de tempo apropriado (por exemplo, uma sessão / um intervalo do tratamento de câncer (por exemplo, cerca de 1,5 a cerca de 5 horas a cerca de 10 horas a cerca de 15 horas a cerca de 20 horas; cerca de 1 dia a cerca de 2 dias a cerca de 5 dias a cerca de 10 dias a cerca de 14 dias)) conforme determinado pelo médico versado (por exemplo, um tempo suficiente para permitir uma sobreposição dos efeitos farmacêuticos das terapias). O composto e o agente anticancerígeno adicional podem ser administrados em uma única dose ou em múltiplas doses em uma ordem e em um esquema adequado para obter um efeito terapêutico desejado (por exemplo, inibição do crescimento tumoral).

[00051] Em uma modalidade, o sujeito nos métodos descritos aqui, neste pedido de patente, não foi tratado previamente com um inibidor de TTK (por exemplo, o composto representado pela Fórmula Estrutural (I)).

[00052] O termo "inibição do crescimento de células de iniciação tumoral" se refere à diminuição da taxa da proliferação e/ou sobrevida

das células de iniciação tumoral.

[00053] Conforme usado aqui, neste pedido de patente, o termo "redução da probabilidade de recidiva de um câncer" significa parcialmente ou totalmente inibir, retardar o retorno de um câncer em ou próximo a um sítio primário e/ou em um sítio secundário depois de um período de remissão. Também significa que o câncer tem menos probabilidade de retornar com o tratamento descrito aqui, neste pedido de patente, do que em sua ausência.

[00054] Conforme usado aqui, neste pedido de patente, o termo "remissão" se refere a um estado de câncer, em que os sintomas clínicos ou indicadores associados com um câncer desapareceram ou não podem ser detectados, tipicamente depois do sujeito ter sido tratado com sucesso com uma terapia anticancerígena.

[00055] Conforme usado aqui, neste pedido de patente, "tratamento" é uma abordagem para obtenção de resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos. Resultados clínicos benéficos ou desejados podem incluir, mas não estão limitados a, alívio ou melhora de um ou mais sintomas ou condições, diminuição da extensão de doença, estado de doença estabilizado (isto é, não piora), redução da probabilidade da disseminação da doença, retardo ou desaceleração da progressão da doença, melhora ou alívio do estado de doença, quer detectável ou indetectável. "Tratamento" também pode significar prolongar a sobrevida em comparação com a sobrevida esperada caso não recebendo tratamento. "Tratamento" também inclui redução da probabilidade de recidiva da doença.

[00056] Conforme usado aqui, neste pedido de patente, "tratar um sujeito com um câncer" inclui realizar, parcialmente ou substancialmente, um ou mais dos seguintes: parada do crescimento, redução da extensão do câncer (por exemplo, redução do tamanho de um tumor), inibição da taxa de crescimento do câncer, melhora ou

aprimoramento de um sintoma clínico ou indicador associado com o câncer (tal como componentes do soro ou tecido) ou aumento da longevidade do sujeito; e redução da probabilidade de recidiva do câncer.

[00057] De modo geral, uma quantidade eficaz de um composto ensinado aqui, neste pedido de patente, varia dependendo de vários fatores, tais como o dado fármaco ou composto, a formulação farmacêutica, a via de administração, o tipo de doença ou distúrbio, a identidade do sujeito ou hospedeiro sendo tratado, e semelhantes, porém não obstante pode ser rotineiramente determinada por uma pessoa versada na arte. Uma quantidade eficaz de um composto dos presentes ensinamentos pode ser prontamente determinada por uma pessoa vom conhecimento regular por meio de métodos de rotina conhecidos na técnica.

[00058] O termo uma "quantidade eficaz" significa uma quantidade a qual, quando administrada ao sujeito, resulta em resultados benéficos ou desejados, incluindo resultados clínicos, por exemplo, inibe, suprime ou reduz o câncer (por exemplo, conforme determinado por sintomas clínicos ou a quantidade de células cancerosas) em um sujeito em comparação com um controle.

[00059] Em uma modalidade, uma quantidade eficaz de um composto ensinado aqui, neste pedido de patente, varia a partir de cerca de 0,1 a cerca de 1000 mg/kg de peso corporal, alternativamente cerca de 1 a cerca de 500 mg/kg de peso corporal, e em outra alternativa, a partir de cerca de 20 a cerca de 300 mg/kg de peso corporal. Em outra modalidade, uma quantidade eficaz de um composto ensinado aqui, neste pedido de patente, varia a partir de cerca de 0.5 a cerca de 5000 mg/m<sup>2</sup>, alternativamente a partir de cerca de 5 a cerca de 2500 mg/m<sup>2</sup>, e em outra alternativa a partir de cerca de 50 a cerca de 1000 mg/m<sup>2</sup>. O técnico versado vai reconhecer que determinados fatores podem

influenciar a dosagem requerida para tratar de modo eficaz um sujeito sofrendo de câncer ou para reduzir probabilidade de recidiva de um câncer. Estes fatores incluem, mas não estão limitados a, a gravidade da doença ou do distúrbio, tratamentos anteriores, a saúde geral e/ou a idade do sujeito e outras doenças presentes.

[00060] Além do mais, para os métodos descritos aqui, neste pedido de patente, (incluindo tratar um sujeito com um câncer ou redução da probabilidade de recidiva de um câncer), um "tratamento" ou regime de dosagem de um sujeito com uma quantidade eficaz do composto dos presentes ensinamentos pode consistir em uma única administração, ou alternativamente compreender uma série de aplicações. Por exemplo, o composto dos presentes ensinamentos pode ser administrado no mínimo uma vez por semana. No entanto, em outra modalidade, o composto pode ser administrado ao sujeito a partir de cerca de uma vez por semana até uma vez ao dia para um determinado tratamento. A extensão do período de tratamento depende de uma variedade de fatores, tais como a gravidade da doença, a idade do paciente, a concentração e a atividade dos compostos dos presentes ensinamentos, ou uma combinação dos mesmos. Também será reconhecido que a dosagem eficaz do composto usado para o tratamento pode aumentar ou diminuir o curso de um regime de tratamento em particular. Modificações na dosagem podem resultar e se tornar evidentes por testes de diagnóstico de rotina conhecidos na técnica. Em alguns casos, pode ser necessária administração crônica.

[00061] Um "sujeito" é um mamífero, de modo preferencial um ser humano, porém também pode ser um animal que necessite de tratamento veterinário, por exemplo, animais de estimação (por exemplo, cães, gatos, e semelhantes), animais de criação (por exemplo, vacas, carneiros, porcos, cavalos, e semelhantes) e animais de laboratório (por exemplo, ratos, camundongos, porquinhos da índia, e

semelhantes).

[00062] Os compostos ensinados aqui, neste pedido de patente, podem ser administrados a um paciente em uma variedade de formas dependendo da via de administração selecionada, conforme será entendido por aqueles versados na técnica. Os compostos dos presentes ensinamentos podem ser administrados, por exemplo, por administração oral, parenteral, bucal, sublingual, nasal, retal, por emplastro, por bomba ou transdérmica e as composições farmacêuticas formuladas por conseguinte. Administração parenteral inclui modos de administração intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, intramuscular, transepitelial, nasal, intrapulmonar, intratecal, retal e tópica. A administração parenteral pode ser por infusão contínua durante um período de tempo selecionado.

[00063] Os compostos ensinados aqui, neste pedido de patente, podem ser formulados convenientemente em composições farmacêuticas para administração a um sujeito. As composições farmacêuticas dos presentes ensinamentos opcionalmente incluem um ou mais veículos e/ou diluentes farmaceuticamente aceitáveis para esse fim, tais como lactose, amido, celulose e dextrose. Outros excipientes, tais como agentes flavorizantes; adoçantes; e conservantes, tais como metil, etil, propil e butil parabenos, também podem ser incluídos. Listagens mais completas de excipientes adequados podem ser encontradas no Handbook of Pharmaceutical Excipients (5<sup>th</sup> Ed., Pharmaceutical Press (2005)). Uma pessoa versada na técnica vai saber como preparar formulações adequadas para vários tipos de vias de administração. Procedimentos e ingredientes convencionais para a seleção e preparação de formulações adequadas são descritos, por exemplo, na Remington's Pharmaceutical Sciences (2003 - 20th edition) e na The United States Pharmacopeia: The National Formulary (USP 24 NF19) publicada em 1999. Os veículos, diluentes e/ou excipientes são "aceitáveis" no sentido de serem

compatíveis com os outros ingredientes da composição farmacêutica e não prejudiciais ao receptor para essa.

[00064] Tipicamente, para administração terapêutica oral, um composto dos presentes ensinamentos pode ser incorporado com excipiente e usado sob a forma de comprimidos ingeríveis, comprimidos bucais, trociscos, cápsulas, elixires, suspensões, xaropes, hóstias, e semelhantes.

[00065] Tipicamente para administração parenteral, soluções de um composto dos presentes ensinamentos podem geralmente ser preparadas em água misturado convenientemente com um tensoativo tal como hidroxipropil celulose. Dispersões também podem ser preparadas em glicerol, polietileno glicóis líquidos, DMSO e misturas dos mesmos com ou sem álcool, e em óleos. Sob condições ordinárias de armazenamento e utilização, estas preparações contêm um conservante para prevenir o crescimento de micro-organismos.

[00066] Tipicamente, para utilização injetável, dispersão ou soluções aquosas estéreis, e pós estéreis, de um composto descrito aqui, neste pedido de patente, para a preparação extemporânea de soluções ou dispersões injetáveis estéreis são apropriadas.

[00067] Para administração nasal, os compostos dos presentes ensinamentos podem ser formulados como aerossóis, gotas, géis e pós. As formulações de aerossóis tipicamente compreendem uma solução ou suspensão fina da substância ativa em um solvente aquoso ou não aquoso fisiologicamente aceitável e são geralmente apresentadas em quantidades únicas ou multidose em forma estéril em um recipiente selado, o qual pode tomar a forma de um cartucho ou refill para utilização com um dispositivo de atomização. Alternativamente, o recipiente selado pode ser um dispositivo de dispensação unitário tal como um inalador nasal de dose única ou um dispensador de aerosol equipado com uma válvula de medição a qual é destinada a descarte

depois da utilização. Onde a forma de dosagem compreende um dispensador de aerossol, vai conter um propelente o qual pode ser um gás comprimido tal como ar comprimido ou um propelente orgânico tal como fluoro cloro hidrocarboneto. As formas de dosagem de aerossol também podem tomar a forma de um atomizador de bomba.

[00068] Para administração bucal ou sublingual, os compostos dos presentes ensinamentos podem ser formulados com um veículo tal como açúcar, goma acácia, goma tragacanto, ou gelatina e glicerina, como comprimidos, drágeas ou pastilhas.

[00069] Para administração retal, os compostos descritos aqui, neste pedido de patente, podem ser formulados sob a forma de supositórios contendo uma base para supositório convencional tal como manteiga de cacau.

[00070] Os compostos da invenção podem ser preparados por métodos de conhecimento daqueles versados na técnica, conforme ilustrado pelos esquemas gerais e procedimentos abaixo e pelos exemplos de preparativos que se seguem. Todos os materiais de partida ou estão disponíveis comercialmente ou podem ser preparados por métodos conhecidos por aqueles versados na técnica e pelos procedimentos descritos abaixo.

[00071] De acordo com outro aspecto da presente invenção, os compostos da invenção podem ser preparados por processos análogos por aqueles estabelecidos na técnica. Métodos gerais para sintetizar os compostos revindicados são elaborados abaixo no Exemplo A.

## EXEMPLIFICAÇÃO

### Exemplo A: Síntese

#### Métodos Gerais

[00072] Matérias primas, reagentes, e solventes disponíveis comercialmente foram usados no estado em que foram recebidos. Em geral, reações anídricas foram realizadas sob uma atmosfera inerte tal

como nitrogênio ou Argônio. PoraPak® Rxn CX se refere a uma resina de permuta de cátions comercial disponível na Waters.

[00073] Reações de micro-ondas foram realizadas com um reator de micro-ondas Biotage Initiator. O progresso da reação geralmente foi monitorado por TLC usando placas de sílica-gel Merck com visualização por UV a 254 nm, por HPLC analítica ou por LCMS (sistema Bruker Exquire 4000 ou Waters Acquity UPLC). Purificação de intermediários ou produtos finais por cromatografia de coluna por cintilação foi realizada usando sílica-gel 60 malha 230-400 da EMD Chemicals ou Silicycle, ou foram purificados usando um Biotage Isolera com cartuchos de sílica KP-SIL ou HP-SIL, ou sílica modificada básica KP-NH e *samplets* correspondentes. Purificação por HPLC de fase reversa foi realizada em um sistema de HPLC Varian PrepStar modelo SD-1 com uma coluna de fase reversa Varian Monochrom 10 $\mu$  C-18 usando um entre cerca de 5 a 30% de MeCN ou MeOH/0,05% de TFA-H<sub>2</sub>O a 70 a 90% MeCN ou MeOH/0,05% de TFA em H<sub>2</sub>O durante um período de 20 a 40 min em uma taxa de fluxo de 30 a 80 mL/min. Purificação de fase reversa também foi realizada usando um Biotage Isolera equipado com uma coluna KP-C18-H usando um entre 10 a 95% de MeOH ou CH<sub>3</sub>CN/ 0,1% de TFA em H<sub>2</sub>O. NMRs de prótons foram registrados em um espectrômetro Bruker 400 MHz, e foram obtidos espectros de massa usando um espectrômetro Bruker Esquire 4000 ou sistema de UPLC Waters Acquity.

[00074] Os nomes dos compostos foram gerados usando o software incorporado na versão 11.0 ou 12.0 da CambridgeSoft-PerkinElmer ChemBioDraw Ultra.

Abreviações:

aq aquosa

Ar argônio

Boc *terc*-butoxicarbonil

br. amplo

calcd calculado

d duplo

DCM diclorometano

DPEA diisopropiletilamina

DMF N,N-dimetilformamida

DMSO dimetilsulfóxido

dppf 1,1'- bis( difenilfosfino) ferroceno

h hora

HPLC cromatografia líquida de alta performance

LC-MS cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa

min minuto

m multiplo

MS ESI espectros de massa, ionização por electrospray

NMR ressonância magnética nuclear

O/N de um dia para o outro

PE éter de petróleo

PMB para-metoxibenzila

prep preparativo

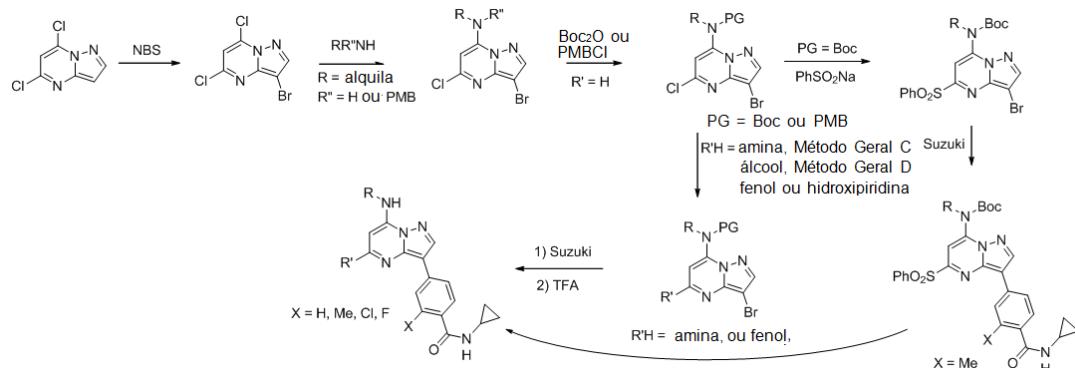
rt temperatura ambiente

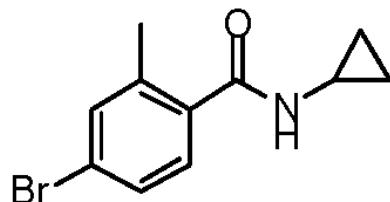
s singuleto

t triplo

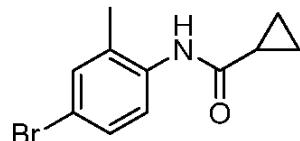
TFA ácido trifluoroacético

THF tetra-hidrofurano



Intermediários:4-bromo-N-ciclopropil-2-metilbenzamida

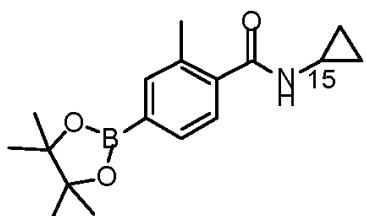
[00075] A uma suspensão de ácido 4-bromo-2-metilbenzoico (43,0 g, 200 mmol) e dicloreto de oxalila (30,5 g, 240 mmol) em DCM (300 mL) foi adicionado DMF (0,1 mL). A mistura da reação resultante foi agitada em temperatura ambiente por 16 h. A reação se transformou em uma solução amarela clara lentamente durante 16 h. Em seguida o solvente foi removido a vácuo, e o produto bruto foi usado na etapa seguinte sem purificação adicional. O produto bruto foi redissolvido em DCM (300 mL) e arrefecido até 0 °C. Uma mistura de TEA (42 mL, 300 mmol) e ciclopropilamina (12,6 g, 220 mmol) em DCM (100 mL) foi adicionada lentamente durante 15 min, e a mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente por 2 h. A reação foi diluída com DCM (200 mL) e foi adicionada água. A mistura resultante foi extraída com DCM e os extratos orgânicos combinados foram secados sobre MgSO<sub>4</sub> e concentrados para proporcionar o produto desejado como um sólido rosa pálido (50,1 g, 99%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,37 (s, 1H), 7,31 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,17 (d, J = 8,1 Hz, 1H), 5,93 (br. s, 1H), 2,90-2,85 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 0,90-0,85 (m, 2H), 0,62-0,58 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 253,9, calculado para [C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>BrNO + H]<sup>+</sup> 254,0.

N-(4-bromo-2-metilfenil)ciclopropanocarboxamida

[00076] Em um RBF de 100 mL, 4-bromo-2-metilanilina (3,7 g, 20

mmol) e DIPEA (6,95 mL, 40 mmol) foram combinados com DMF (40 mL). A reação foi arrefecida até 0°C em um banho de gelo e cloreto de ciclopropanocarbonila (2,1 g, 20 mmol) foi adicionado. A mistura foi agitada a 0°C por 1 h. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. As camadas orgânicas foram combinadas, secadas sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtradas, e concentradas sob pressão reduzida para proporcionar o composto do título como um sólido branco (4,76 g, 94%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,85-7,72 (m, 1H), 7,38-7,28 (m, 2H), 7,15-7,02 (m, 1H), 2,27 (s, 3H), 1,57-1,48 (m, 1H), 1,10 (quint, *J* = 3,9 Hz, 2 H), 0,92-0,79 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 253,9, calculado para [C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>BrNO + H]<sup>+</sup> 254,0.

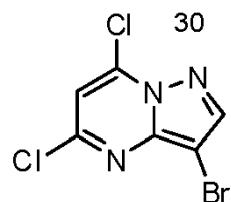
N-ciclopropil-2-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzamida



[00077] A uma mistura de 4-bromo-N-ciclopropil-2-metilbenzamida (3,73 g, 14 mmol), Bis(pinacolato)diboro (5,59 g, 22 mmol), e KOAc (4,29 g, 43 mmol) em DMF (37 mL) foram purgados com Ar por 10 min em temperatura ambiente. Em seguida PdCl<sub>2</sub>(dppf)·DCM (0,59 g, 5 mol%) foi adicionado e a reação foi aquecida a 100 °C em banho de óleo por 4 h. Depois do completamento da reação, a massa da reação foi diluída com EtOAc (200 mL) e H<sub>2</sub>O (100 mL). A camada combinada foi filtrada através de bloco de celite e foi lavada com pouco EtOAc. A camada aquosa foi adicionalmente extraída com EtOAc (50 mL) e a camada orgânica combinada foi lavada com salmoura, secada sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrada, e concentrada para proporcionar resíduo oleoso bruto. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 0 a 100%) para proporcionar o composto do

título como um sólido cremoso (4,15 g, 94%),  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 7,66 (s, 1H), 7,63-7,61 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1 H), 7,32-7,30 (d,  $J$  = 7,6 Hz, 1H), 5,85 (s, 1 H), 2,93-2,87 (m, 1H), 2,46 (s, 3H), 1,35 (s, 12H), 0,90-0,86 (m, 2H), 0,63-0,59 (m, 2H); MS ESI [M + H] $^+$  302,2, calculado para  $[\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{BNO}_3 + \text{H}]^+$  302,2.

3-bromo-5,7-dicloropirazolo[1,5-a]pirimidina



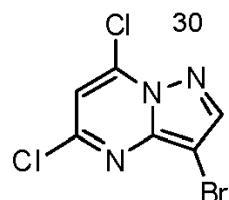
[00078] A uma solução agitada de etóxido de sódio em EtOH, o qual foi preparado a partir de sódio (281,3 g, 12,0 mol) e EtOH (10 L) pelo método convencional, foram adicionados malonato de dietila (963,7 g, 6,02 mol) em temperatura ambiente e em seguida o composto 1H-pirazol-3-amina (500 g, 6,02 mol). A mistura da reação foi refluxada por 12 horas. Depois de ter sido arrefecida até a temperatura ambiente, os precipitados foram coletados por filtração e dissolvidos em água. A solução aquosa foi acidificada com 2 M de HCl (pH = 2). Os precipitados resultantes foram coletados por filtração e secados sob pressão reduzida para proporcionar pirazolo[1,5-a]pirimidina-5,7(4H,6H)-diona (649 g, 71%) como um sólido amarelo, o qual foi usado para a reação seguinte sem purificação adicional.

[00079] Uma suspensão agitada de pirazolo[1,5-a]pirimidina-5,7(4H, 6H)-diona (265 g, 1,75 mol) e *N,N*-dimetilanilina (335,6 mL) em  $\text{POCl}_3$  (2,00 kg, 13,2 mol) foi refluxada por 4 horas. Depois de ter sido arrefecida até a temperatura ambiente, a mistura da reação foi vertida em água gelada, e agitada por 30 min, neutralizada com carbonato de sódio aquoso saturado e extraída com EtOAc. As camadas orgânicas combinadas foram lavadas com água, salmoura e secadas sobre  $\text{MgSO}_4$ , filtradas e evaporadas. O resíduo foi purificado por

cromatografia de coluna sobre sílica-gel (gradiente: EtOAc/PE a 1:10) para proporcionar 5,7-dicloropirazolo[1,5-a]pirimidina (287 g, 87%) como um sólido amarelo.

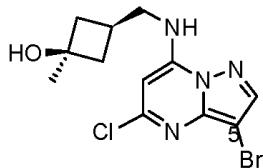
[00080] A uma solução 5,7-dicloropirazolo[1,5-a]pirimidina (246,6 g, 1,31 mol) em CH<sub>3</sub>CN (1,8 L) foi adicionado NBS (245 g, 1,38 mol). A mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente por 2 horas. Depois de remoção da solução, a mistura da reação foi purificada por cromatografia de coluna sobre sílica-gel (gradiente: EtOAc/PE a 1:5) para proporcionar o composto do título (313,5 g, 89%) como sólido amarelo claro. <sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ ppm 7,04 (s, 1H), 8,21 (s, 1H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 265,9, calculado para [C<sub>6</sub>H<sub>2</sub>BrCl<sub>2</sub>N<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup> 265,9.

3-bromo-5-cloro-N-(ciclopropilmetil)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-amina



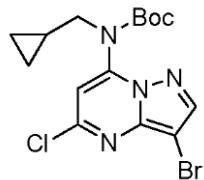
[00081] A uma solução de 3-bromo-5,7-dicloropirazolo[1,5-a]pirimidina (5,0 g, 19 mmol) em DCM (50 mL) foram adicionados ciclopropilmetanamina (1,48 g, 21 mmol), e DIPEA (6,6 mL, 38 mmol). A reação foi agitada em temperatura ambiente por 2 h. Água e DCM foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com DCM. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre NaSO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 0 a 50%) para proporcionar o composto do título como um sólido amarelo (5,25 g, 92%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,97 (s, 1H), 6,50 (br. s, 1H), 5,97 (s, 1H), 3,25 (dd, J = 7,3, 5,5 Hz, 2H), 1,26-1,13 (m, 1H), 0,74-0,65 (m, 2H), 0,37 (q, J = 5,0 Hz, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 301,0, calculado para [C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>BrClN<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 301,0.

(1s,3s)-3-(((3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)metyl)-1-

metilciclobutanol

[00082] A uma solução de 3-bromo-5,7-dicloropirazolo[1,5-a]pirimidina (14,6 g, 55,3 mmol) em DCM (200 mL) foram adicionados cis-hidroxi-3-metilciclobutano-1-metilamina (7,0 g, 60,9 mmol), e DIPEA (19,2 mL, 110,6 mmol). A reação foi agitada em temperatura ambiente por 16 h. Água e DCM foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com DCM. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados para proporcionar o composto do título como um sólido amarelo (18,1 g, 95%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,96 (s, 1 H), 6,60-6,49 (m, 1H), 5,99 (s, 1H), 3,47 (t, J = 6,0 Hz, 2H), 2,38-2,27 (m, 3H), 1,96-1,85 (m, 2H), 1,43 (s, 3H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 345,1, calculado para [C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>BrClN<sub>4</sub>O + H]<sup>+</sup> 345,0.

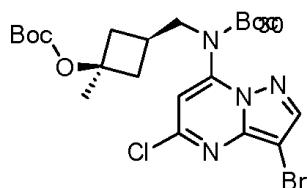
(3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(ciclopropilmetyl)carbamato de terc-butila



[00083] A uma solução de 3-bromo-5-cloro-N-(ciclopropilmetyl)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-amina (5,25 g, 17,5 mmol) em DCM (150 mL) foram adicionados Boc<sub>2</sub>O (5,70 g, 26,2 mmol), DMAP (0,21 g, 1,75 mmol), e TEA (7,3 mL, 52,5 mmol). A reação foi agitada em temperatura ambiente por 4 h. Água e DCM foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com DCM. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 0 a 40 %) para proporcionar o composto do título como um

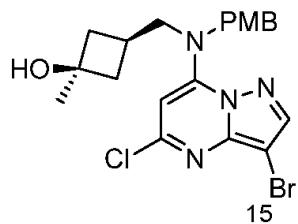
sólido amarelo (6,24 g, 89%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8,12 (s, 1H), 6,85 (s, 1H), 3,72 (d,  $J = 7,3$  Hz, 2H), 1,39 (s, 9H), 1,05-0,94 (m, 1H), 0,46-0,37 (m, 2H), 0,13-0,03 (m, 2H); MS ESI [M –  $\text{C}_4\text{H}_8$ ] $^+$  345,0, calculado para  $[\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{BrClN}_4\text{O}_2 - \text{C}_4\text{H}_8]^+$  345,0.

(3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(((1s,3s)-3-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilciclobutil)metil)carbamato de terc-butila



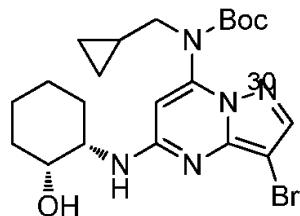
[00084] A uma solução de (1s,3s)-3-((3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)metil)-1-metilciclobutanol (18,1 g, 52,6 mmol),  $\text{Boc}_2\text{O}$  (34,3 g, 158 mmol), e ), e TEA (22 mL, 157,8 mmol) em DCM (200 mL) foi adicionado DMAP (1,28 g, 10,5mmol). A reação foi agitada a 40 °C por 16 h. O solvente foi removido a vácuo e água e DCM foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com DCM. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre  $\text{NaSO}_4$ , filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (3 colunas Biotage de 100 g de  $\text{SiO}_2$  em paralelo, gradiente: EtOAc/hex a 0 a 30%) para proporcionar o composto do título como um sólido bege (12,7 g, 44%).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  ppm 8,11 (s, 1H), 6,74 (s, 1H), 3,88 (d,  $J = 6,5$  Hz, 2H), 2,17 (s, 3H), 1,99-1,88 (m, 2H), 1,47 (s, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,35 (s, 9H); MS ESI [M + H] $^+$  545,1, calculado para  $[\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{BrClN}_4\text{O}_5 + \text{H}]^+$  545,1.

(1s,3s)-3-((3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(4-metoxibenzoil)amino)metil)-1-metilciclobutanol



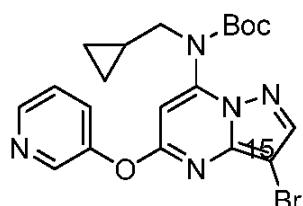
[00085] A uma solução de (1s,3s)-3-(((3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)amino)metil)-1-metilciclobutanol (12,0 g, 34,7 mmol) e cloreto de 4-metoxibenzila (5,2 mL, 38,2 mmol) em DMF (50 mL) foi adicionado K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (9,6 g, 69,4 mmol). A mistura resultante foi agitada a 60 °C por 3 h. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram lavados com água, secados sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 10 a 100%) usando três colunas em paralelo. As frações impuras foram coletadas e purificadas por cromatografia por cintilação usando as condições acima. As frações puras foram combinadas e concentradas para proporcionar o produto desejado como um sólido amarelo pálido (13,1 g, 81%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8,01 (s, 1H), 7,17 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,67 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,02 (s, 1H), 4,98 (s, 2H), 3,83 (d, J = 6,4 Hz, 2H), 3,81 (s, 3H), 2,25-2,16 (m, 3H), 1,76-1,72 (m, 2H), 1,36 (s, 3H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 467,1, calculado para [C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>BrClN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> 467,1.

(3-bromo-5-(((1S,2R)-2-hidroxiciclo-hexil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(ciclopropilmetil)carbamato de terc-butila



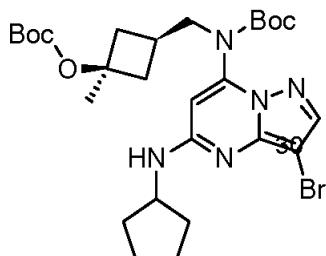
[00086] A uma solução de usando (3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(ciclopropilmetil)carbamato de terc-butila (9,0 g, 22,5 mmol) em NMP (90 mL) foram adicionados (1R,2S)-2-aminociclo-hexanol-HCl (4,08 g, 27,0 mmol), e DIPEA (3,47 g, 25,1 mmol). A reação foi dividida e selada dentro de seis frascos pequenos de micro-ondas. Cada frasco foi submetido a micro-ondas por 3 h a 130°C. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com

EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 0 a 50%) usando três colunas em paralelo para proporcionar o composto do título como um sólido bege (8,51 g, 79%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,80 (s, 1H), 6,08 (s, 1H), 5,33-5,19 (m, 1H), 4,26-4,14 (m, 1H), 4,13-4,06 (m, 1H), 3,61 (d, J = 7,3 Hz, 2H), 2,51 (br. s, 1H), 1,89-1,62 (m, 8H), 1,55-1,45 (m, 2H), 1,40 (s, 9H), 1,06-0,95 (m, 1H), 0,47-0,38 (m, 2H), 0,17-0,07 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 408,3, calculado para [C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup> 480,2. (3-bromo-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(ciclopropilmetil)carbamato de terc-butila



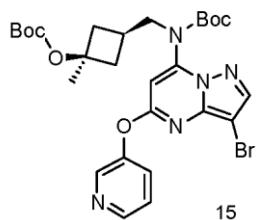
[00087] Uma mistura de (3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(ciclopropilmetil)carbamato de terc-butila (400 mg, 1,0 mmol), 3-hidroxi-piridina (475 mg, 5,0 mmol), DBU (0,75 mL, 5,0 mmol) em DME (5 mL) foi combinada e selada dentro de um frasco pequeno de micro-ondas. A mistura foi submetida a microondas por 1 h a 85°C. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 0 a 50%) para proporcionar o composto do título como um óleo marrom (367 mg, 80%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8,64 (d, J = 2,5 Hz, 1H) 8,54 (dd, J = 4,5, 1,5 Hz, 1H) 7,97 (s, 1H), 7,78-7,72 (m, 1H), 7,44-7,38 (m, 1H) 6,61 (s, 1H) 3,71 (d, J = 7,3 Hz, 2H) 1,39 (s, 9 H), 1,06-1,01 (m, 1H) 0,45 (s, 2H), 0,13-0,09 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 460,0, calculado para [C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup> 460,1.

(3-bromo-5-(ciclopentilamino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(((1s,3s)-3-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilciclobutil)metil)carbamato de terc-butila



[00088] A uma solução de (3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(((1s,3s)-3-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilciclobutil)metil)carbamato de terc-butila (0,45 g, 0,83 mmol) em NMP (4 mL) foram adicionados ciclopentilamina (0,085 g, 1,0 mmol), e DIPEA (0,21 g, 1,66 mmol). A reação foi submetido a micro-ondas por 3 h a 130°C. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 0 a 60%) para proporcionar o composto do título como um sólido branco (0,40 g, 67%).  
<sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 7,79 (s, 1H), 5,94 (s, 1H), 5,08 (br. s, 1H), 4,23 (br. s, 1H), 3,85-3,72 (m, 2H), 2,28-2,06 (m, 5H), 2,02-1,89 (m, 2H), 1,81-1,61 (m, 5H), 1,48 (s, 4H), 1,44 (s, 9H), 1,36 (s, 9H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 594,3, calculado para [C<sub>27</sub>H<sub>40</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>5</sub> + H]<sup>+</sup> 594,2.

(3-bromo-5-(piridin-3-iloxy)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(((1s,3s)-3-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilciclobutil)metil)carbamato de terc-butila

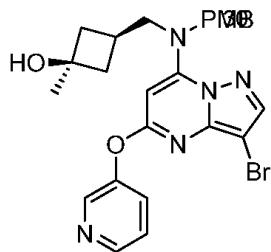


15

[00089] Uma mistura de (3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(((1s,3s)-3-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilciclobutil)metil)carbamato de terc-butila (12,7 g, 23,3 mmol), 3-hidroxipiridina (4,43 g, 46,6 mmol),

e  $K_2CO_3$  (9,65 g, 69,9 mmol) foi combinada em DMF (100 mL) e agitada em temperatura ambiente de um dia para o outro. A mistura da reação foi diluída com EtOAc e lavada com água, secada sobre  $Na_2SO_4$ , filtrada e concentrada a vácuo. O produto bruto foi triturado com  $Et_2O$  e filtrado para proporcionar o composto do título como um sólido bege (8,43 g, 14,0 mmol). O licor matriz foi concentrado a vácuo e purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 0 a 40%) para proporcionar o composto do título como um sólido laranja claro (4,07 g, 6,74 mmol). Os sólidos obtidos através de trituração e cromatografia por cintilação foram combinados para proporcionar o composto do título como um sólido laranja claro (12,50 g, 89%)  $^1H$  NMR (400 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  ppm 8,65 (d,  $J$  = 2,8 Hz, 1H), 8,55 (dd,  $J$  = 4,6, 1,4 Hz, 1H), 7,98 (s, 1H), 7,78-7,73 (m, 1H), 7,46-7,40 (m, 1H), 6,50 (s, 1H), 3,89 (d,  $J$  = 6,8 Hz, 2H), 2,30-2,15 (m, 3H), 2,02-1,93 (m, 2H), 1,50 (s, 3H), 1,45 (s, 9H), 1,38 (s, 9H); MS ESI [M + H] $^+$  604,3, calculado para  $[C_{27}H_{34}BrN_5O_6 + H]^+$  604,2.

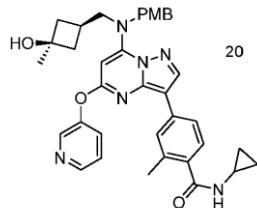
(1s,3s)-3-(((3-bromo-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(4-metoxibenzil)amino)metil)-1-metilciclobutanol



[00090] A uma solução de (1s,3s)-3-(((3-bromo-5-cloropirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(4-metoxibenzil)amino)metil)-1-metilciclobutanol (13,1 g, 28,2 mmol) e 3-hidroxipiridina (4,0 g, 42,3 mmol) em DMF (70 mL) foi adicionado  $K_2CO_3$  (7,8 g, 56,3 mmol). A mistura resultante foi agitada a 80 °C por 22 h. Uma mistura de 60% NaH (0,6 g, 15 mmol) e 3-hidroxipiridina (1,4 g, 14,7 mmol) em DMF foi agitada em temperatura ambiente por 30 min antes de adicionar à mistura da reação. A solução

resultante foi agitada a 100 °C por 20 h. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram lavados com água, secados sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hexanos a 10 a 100%) usando três colunas em paralelo. As frações impuras foram coletadas e purificadas por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hexanos a 50 a 100%). As frações puras foram combinadas e concentradas para proporcionar o produto desejado como um sólido amarelo pálido (9,5 g, 64%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8,56 (d, J = 4 Hz, 1H), 8,45 (d, J = 8 Hz, 1H), 8,00 (s, 1H), 7,69-7,65 (m, 1H), 7,36 (dd, J = 4,8, 0,4 Hz, 1H), 7,19 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 6,85 (d, J = 8,7 Hz, 2H), 5,71 (s, 1H), 4,91 (s, 2H), 3,87 (d, J = 6,7 Hz, 2H), 3,87 (s, 3H), 2,30-2,15 (m, 3H), 1,77 (t, J = 8,1 Hz, 2H), 1,37 (s, 3H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 524,2, calculado para [C<sub>25</sub>H<sub>26</sub>BrN<sub>5</sub>O<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup> 524,1.

N-ciclopropil-4-(7-(((1s,3s)-3-hidroxi-3-metilciclobutil)metil)(4-metoxibenzoil)amino)-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-2-metilbenzamida

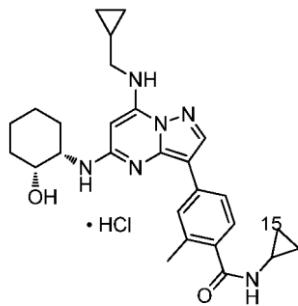


[00091] Uma mistura de (1s,3s)-3-((3-bromo-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(4-metoxibenzoil)amino)metil-1-metilciclobutanol (9,5 g, 18,1 mmol), N-ciclopropil-2-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzamida (7,6 g, 25,4 mmol), 2M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (23 mL, 45,3 mmol) em THF (100 mL) foi purgada com Ar por 10 min antes da adição de PdCl<sub>2</sub>dppf·DCM (1,5 g, 1,8 mmol). A mistura resultante foi aquecida sob refluxo em um banho de óleo a 84°C por 16 h. A mistura da reação foi diluída com DCM e NaHCO<sub>3</sub> sat.. A fase aquosa foi extraída com

DCM e os extratos orgânicos combinados foram secados sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 50 a 100%) usando três colunas em paralelo. As frações impuras foram coletadas e purificadas por cromatografia por cintilação usando as condições acima. As frações puras foram combinadas e concentradas para proporcionar o produto desejado como um sólido laranja (9,6 g, 85%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ ppm 8,90-8,84 (m, 1H), 8,55 (d, J = 4,5 Hz, 1H), 8,29 (s, 1H), 7,88-7,83 (m, 1H), 7,63 (s, 1H), 7,58-7,53 (m, 2H), 7,35-7,31 (m, 1H), 7,23 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,89 (d, J = 8,6 Hz, 2H), 6,19 (br. s, 1H), 5,82 (s, 1H), 4,99 (s, 2H), 3,90 (d, J = 10,0 Hz, 2H), 3,80 (s, 3H), 2,93-2,90 (m, 1H), 2,40 (s, 3H), 2,36-2,28 (m, 1H), 2,22-2,20 (m, 2H), 1,89-1,88 (m, 1H), 1,80 (t, J = 8,7 Hz, 2H), 1,38 (s, 3H), 0,88-0,85 (m, 2H), 0,68-0,64 (m, 2H); MS ESI 619,3 [M + H]<sup>+</sup>, calculado para [C<sub>36</sub>H<sub>38</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub> + H]<sup>+</sup> 619,3.

Preparação de Compostos de Exemplo da Invenção

A1: cloridrato de N-ciclopropil-4-(7-((ciclopropilmetil)amino)-5-(((1S,2R)-2-hidroxiciclo-hexil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-2-metilbenzamida

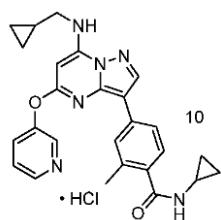


[00092] Uma mistura de (3-bromo-5-(((1S,2R)-2-hidroxiciclo-hexil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(ciclopropilmetil)carbamato de terc-butila (8,48 g, 17,7 mmol), N-ciclopropil-2-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzamida (6,92 g, 23,0 mmol), PdCl<sub>2</sub>dppf·DCM (1,44 g, 1,76 mmol), e 2M K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (26,6 mL, 106,2 mmol) em THF (60 mL) foi dividida e selada dentro de quatro frascos pequenos de micro-

ondass. Cada frasco foi carregado com Ar e aquecido no micro-ondas a 125°C por 3 h. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 20 a 100%) usando duas colunas em paralelo para proporcionar um sólido amarelo.

[00093] O composto acima foi dissolvido em DCM (20 mL) e tratado com TFA (20 mL) em temperatura ambiente por 1 h. Depois do completamento da reação, o solvente foi removido a vácuo e o produto bruto foi redissolvido em DCM (20 mL), neutralizado com bicarbonato de sódio aquoso saturado e extraído com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre NaSO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 50 a 100% e em seguida MeOH/DCM a 0 a 10%) e triturado com Et<sub>2</sub>O para proporcionar o composto do título como uma base livre (sólido branco). A base livre foi dissolvida em uma mistura de DCM (25 mL) e MeOH (50 mL), HCl (1 M de Et<sub>2</sub>O, 2 equiv) foi em seguida adicionada lentamente. O solvente foi removido a vácuo para proporcionar o composto do título como um sólido amarelo pálido em sal de HCl (2,09 g, 25% durante 2 etapas). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 8,21 (s, 1H), 7,51-7,37 (m, 3H), 5,67 (br. s, 1H), 4,04-3,82 (m, 2H), 3,46-3,37 (m, 2H), 2,93-2,82 (m, 1H), 2,47 (s, 3H), 1,89-1,64 (m, 6H), 1,61-1,42 (m, 2H), 1,31-1,21 (m, 1H), 0,88-0,78 (m, 2H), 0,70-0,58 (m, 4H), 0,46-0,36 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 475,3, calculado para [C<sub>27</sub>H<sub>34</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> 475,3. Pureza por HPLC: 98% a 254 nm.

A2: cloridrato de *N*-ciclopropil-4-(7-((ciclopropilmetil)amino)-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-2-metilbenzamida

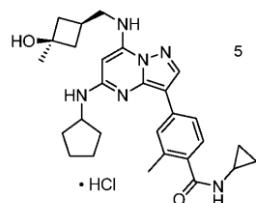


[00094] Uma mistura de *(3-bromo-5-(piridin-3-oxo)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(ciclopropilmetyl)carbamato de terc-butila* (367 mg, 0,80 mmol), N-ciclopropil-2-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzamida (289 mg, 0,96 mmol), PdCl<sub>2</sub>dppf·DCM (65 mg, 0,080 mmol), e 2 M de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1,4 mL, 2,8 mmol) em THF (4 mL) foi selada dentro de um frasco pequeno de micro-ondas. O frasco foi carregado com Ar e aquecido no micro-ondas a 130°C por 4 h. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 20 a 100%) para proporcionar um óleo amarelo.

[00095] O composto acima foi dissolvido em DCM (6 mL) e tratado com TFA (2 mL) em temperatura ambiente por 1 h. Depois do completamento da reação, o solvente foi removido a vácuo e o produto bruto foi redissolvido em MeOH (4 mL), filtrado, e purificado por HPLC prep. As frações foram passadas através de uma coluna PoraPak e foram trituradas com Et<sub>2</sub>O para proporcionar o composto do título como uma base livre (sólido branco, 119 mg). Uma porção da base livre (67 mg, 0,15 mmol) foi em seguida dissolvida em MeOH (10 mL), e HCl (1 M de Et<sub>2</sub>O, 2 equiv) foi em seguida adicionada lentamente. A mistura foi concentrada e triturada com Et<sub>2</sub>O para proporcionar o composto do título como um sólido amarelo em sal de HCl (55 mg, 25% de rendimento durante 2 etapas). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 9,10 (s, 1H), 8,82 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 8,73-8,66 (m, 1H), 8,41 (s, 1H), 8,24-8,15 (m, 1H), 7,69 (s, 1H), 7,60 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,23 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,07 (s,

1H), 3,39 (d,  $J = 7,0$  Hz, 2H), 2,89-2,78 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 1,37-1,23 (m, 1H), 0,86-0,75 (m, 2H), 0,70-0,56 (m, 4H), 0,45-0,38 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 455,2, calculado para [C<sub>26</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O<sub>2</sub> + H]<sup>+</sup> 455,2. Pureza por HPLC: 95,9% a 254 nm.

A3: cloridrato de 4-(5-(ciclopentilamino)-7-(((1s,3s)-3-hidroxi-3-metilciclobutil)metil)amino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-N-ciclopropil-2-metilbenzamida

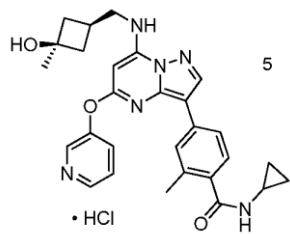


[00096] Uma mistura de (3-bromo-5-(ciclopentilamino)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il))((1s,3s)-3-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilciclobutil)metil)carbamato de terc-butila (0,40 g, 0,67 mmol), N-ciclopropil-2-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzamida (0,26 g, 0,88 mmol), PdCl<sub>2</sub>dppf·DCM (0,055 g, 0,067 mmol), e 2 M de K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1 mL, 2,01 mmol) em THF (4 mL) foi carregada com Ar e aquecida no micro-ondas a 130°C por 3 h. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 20 a 100%) para proporcionar um óleo amarelo.

[00097] O composto acima foi dissolvido em DCM (10 mL) e tratado com TFA (3 mL) em temperatura ambiente por 3 h. Depois do completamento da reação, o solvente foi removido a vácuo e o produto bruto foi dissolvido em MeOH (5 mL). A mistura foi filtrada e purificada por HPLC prep. O composto foi passado através de um cartucho PoraPak e triturado com Et<sub>2</sub>O para proporcionar o composto do título como uma base livre (sólido branco). A base livre foi dissolvida em MeOH (5 mL), e HCl (1 M de Et<sub>2</sub>O, 2 equiv) foi em seguida adicionado

lentamente. O solvente foi removido a vácuo para proporcionar o composto do título como um sólido laranja claro em sal de HCl (75 mg, 21% durante 2 etapas).  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  ppm 8,18 (s, 1H), 7,42 (s, 3H), 5,52 (br. s, 1H), 4,23-4,11 (m, 1H), 3,68-3,54 (m, 2H), 2,93-2,81 (m, 1H), 2,46 (s, 3H), 2,38-2,27 (m, 1H), 2,26-2,07 (m, 4H), 1,99-1,89 (m, 2H), 1,88-1,59 (m, 6H), 1,35 (s, 3H), 0,86-0,79 (m, 2H), 0,66-0,58 (m, 2H); MS ESI [M + H] $^+$  489,4, calculado para  $[\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_6\text{O}_2 + \text{H}]^+$  489,3. Pureza por HPLC: 99% a 254 nm.

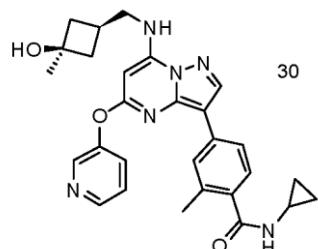
A4: cloridrato de N-ciclopropil-4-(7-(((1s,3s)-3-hidroxi-3-metilciclobutil)metil)amino)-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-2-metilbenzamida e sua base livre



A). Através de desproteção Boc: Uma mistura de (3-bromo-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-7-il)(((1s,3s)-3-((terc-butoxicarbonil)oxi)-3-metilciclobutil)metil)carbamato de terc-butila (0,23 g, 0,38 mmol), N-ciclopropil-2-metil-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)benzamida (0,15 g, 0,49 mmol),  $\text{PdCl}_2\text{dppf}\cdot\text{DCM}$  (0,15 g, 0,49 mmol), e 2 M de  $\text{K}_3\text{PO}_4$  (0,57 mL, 1,14 mmol) em THF (4 mL) foi carregada com Ar e aquecida no micro-ondas a 130°C por 3 h. Água e EtOAc foram adicionados para separar as fases e a fase aquosa foi extraída com EtOAc. Os extratos orgânicos combinados foram secados sobre  $\text{NaSO}_4$ , filtrados e concentrados. O produto bruto foi purificado por cromatografia por cintilação (gradiente: EtOAc/hex a 20 a 60%) para proporcionar um óleo amarelo.

[00098] O intermediário acima foi dissolvido em DCM (10 mL) e tratado com TFA (3 mL) em temperatura ambiente por 3 h. Depois do completamento da reação, o solvente foi removido a vácuo e o produto

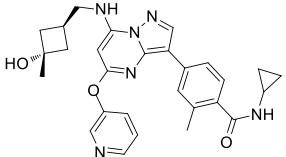
bruto foi dissolvido em MeOH (5 mL). A mistura foi filtrada e purificada por HPLC prep. O composto foi passado através de um cartucho PoraPak e triturado com Et<sub>2</sub>O para proporcionar o composto do título como uma base livre (sólido branco). A base livre foi dissolvida em MeOH (5 mL), e HCl (1 M de Et<sub>2</sub>O, 2 equiv) foi em seguida adicionado lentamente. O solvente foi removido a vácuo para proporcionar o composto do título como um sólido bege em sal de HCl (96 mg, 47% durante 2 etapas). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 9,14 (br. s, 1H), 8,89-8,82 (m, 1H), 8,79-8,71 (m, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,31-8,21 (m, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,59 (d, *J* = 9,5 Hz, 1H), 7,23 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,06 (s, 1H), 3,56 (d, *J* = 6,5 Hz, 2H), 2,88-2,79 (m, 1H), 2,40-2,31 (m, 1H), 2,29 (s, 3H), 2,26-2,18 (m, 2H), 1,99-1,89 (m, 2H), 1,37 (s, 3H), 0,85-0,76 (m, 2H), 0,63-0,53 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 499,3, calculado para [C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup> 499,2. Pureza por HPLC: 99,5% a 254 nm.

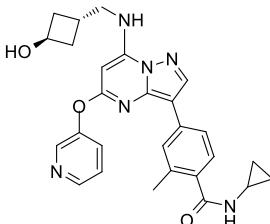
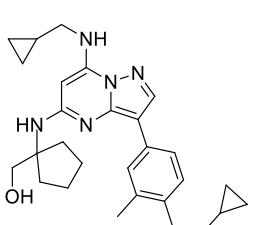


B). Através de desproteção de PMB: Uma mistura de N-ciclopropil-4-(7-(((1s,3s)-3-hidroxi-3-metilciclobutil)metil)(4-metoxiben-zil)amino)-5-(piridin-3-iloxi)pirazolo[1,5-a]pirimidin-3-il)-2-metilbenzami-da (9,6 g, 15,5 mmol), TFA (50 mL) em DCE (70 mL) foi aquecida em um banho de óleo a 50 °C por 4 h. Depois do completamento da reação, o solvente foi removido a vácuo e o produto bruto foi dissolvido em uma mistura de MeOH/DCM (100 mL/25 mL). 2 M de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (150 mL) foi em seguida adicionado e a mistura resultante foi agitada em temperatura ambiente por 30 min. A mistura da reação foi diluída com DCM e as fases foram separadas. A fase aquosa foi extraída com DCM e os extratos orgânicos combinados foram lavados com água, secados sobre MgSO<sub>4</sub>, filtrados e concentrados. O produto bruto foi triturado e

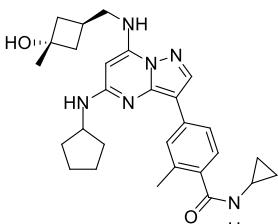
sonicado em uma mistura de DCM/Et<sub>2</sub>O (10 mL/70 mL) para proporcionar o composto do título como um sólido acinzentado em base livre (5,9 g, 77%). <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ ppm 8,58-8,53 (m, 1H), 8,50-8,46 (m, 1H), 8,36 (s, 1H), 7,86-7,80 (m, 1H), 7,76-7,72 (m, 1H), 7,61-7,55 (m, 2H), 7,18 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 5,92 (s, 1H), 3,52 (d, *J* = 6,8 Hz, 2H), 2,86-2,77 (m, 1H), 2,38-2,28 (m, 1H), 2,25 (s, 3H), 2,24-2,18 (m, 2H), 1,99-1,88 (m, 2H), 1,37 (s, 3H), 0,84-0,75 (m, 2H), 0,64-0,54 (m, 2H); MS ESI [M + H]<sup>+</sup> 499,2, calculado para [C<sub>28</sub>H<sub>30</sub>N<sub>6</sub>O<sub>3</sub> + H]<sup>+</sup> 499,2. Pureza por HPLC: 96,1% a 235 nm.

[00099] Os compostos finais que se seguem foram sintetizados de modo similar às sínteses de A1 a 4.

Estrutura	Número do Exemplo MS calculada; MS ESI [M+H] <sup>+</sup> Forma de Sal; Pureza por HPLC	<sup>1</sup> H NMR
	A5 [C <sub>28</sub> H <sub>30</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup> 499,2; 499,3; base livre; 98,9% a 254 nM	(400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm 8,55 (dd, <i>J</i> = 2,8, 0,4 Hz, 1H), 8,47 (dd, <i>J</i> = 4,8, 1,6 Hz, 1H), 8,33 (s, 1 H), 7,83-7,80 (m, 1H), 7,72 (s, 1H), 7,58-7,55 (m, 2H), 7,18 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 5,89 (s, 1H), 3,49 (d, <i>J</i> = 7,6 Hz, 2H), 2,87-2,78 (m, 2H), 2,28-2,23 (m, 5H), 1,97-1,92 (m, 2H), 1,36 (s, 3H), 0,82-0,77 (m, 2H), 0,62-0,58 (m, 2H).

Estrutura	Número do Exemplo MS calculada; MS ESI [M+H] <sup>+</sup> Forma de Sal; Pureza por HPLC	<sup>1</sup> H NMR
	A6 [C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> +H] <sup>+</sup> 485,2; 485,3; sal de HCl; 98,8% a 254 nm	(400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm 9,13 (d, J = 2,3 Hz, 1H), 8,86 (d, J = 5,8 Hz, 1H), 8,77-8,69 (m, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,26 (dd, J = 8,8, 5,8 Hz, 1H), 7,67 (s, 1H), 7,59 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 7,24 (d, J = 8,0 Hz, 1H), 6,07 (s, 1H), 4,53-4,39 (m, 1H), 3,57 (d, J = 8,0 Hz, 2H), 2,89-2,79 (m, 1H), 2,76- 2,61 (m, 1H), 2,30 (s, 3H), 2,29-2,21 (m, 2H), 2,21- 2,08 (m, 2H), 0,85-0,78 (m, 2H), 0,65-0,58 (m, 2H).
	A8 [C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 475,3; 475,4; sal de HCl; 99,3% a 254 nm	(400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm 8,22 (s, 1H), 7,51-7,36 (m, 3H), 5,68 (s, 1H), 3,77 (s, 2H), 3,37-3,33 (m, 2H), 2,93-2,84 (m, 1H), 2,47 (s, 3H), 2,07-1,95 (m, 4H), 1,93-1,72 (m, 4H), 1,34- 1,19 (m, 1H), 0,88-0,78 (m, 2H), 0,69-0,59 (m, 4H), 0,45-0,37 (m, 2H).

Estrutura	Número do Exemplo <b>MS calculada;</b> <b>MS ESI [M+H]<sup>+</sup></b> <b>Forma de Sal;</b> <b>Pureza por HPLC</b>	<sup>1</sup> H NMR
	A11 [C <sub>27</sub> H <sub>28</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> + H] <sup>+</sup> 485,2 485,2; sal de HCl; 98,6% a 254 nm	(400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm 9,14 (s, 1H), 8,85 (d, <i>J</i> = 5,5 Hz, 1H), 8,79-8,72 (m, 1H), 8,40 (s, 1H), 8,30-8,21 (m, 1H), 7,68 (s, 1H), 7,59 (d, <i>J</i> = 7,8 Hz, 1H), 7,23 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H), 6,06 (s, 1H), 4,17-4,06 (m, 1H), 3,54 (d, <i>J</i> = 6,5 Hz, 2H), 2,88-2,78 (m, 1H), 2,53-2,43 (m, 2H), 2,29 (s, 4H), 1,81-1,68 (m, 2H), 0,84-0,77 (m, 2H), 0,62-0,56 (m, 2H).
	A12 [C <sub>27</sub> H <sub>34</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> +H] <sup>+</sup> 475,3; 475,4; sal de HCl; 97,5% a 254 nm	(400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm 8,18 (s, 1H), 7,55-7,29 (m, 3H), 5,54 (br, s, 1H), 4,50-4,37 (m, 1H), 4,26-4,07 (m, 1H), 3,62 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H), 2,92-2,83 (m, 1H), 2,75-2,61 (m, 1H), 2,46 (s, 3H), 2,31-2,02 (m, 6H), 1,92-1,56 (m, 6H), 0,91-0,75 (m, 2H), 0,71-0,52 (m, 2H).

Estrutura	Número do Exemplo MS calculada; MS ESI [M+H] <sup>+</sup> Forma de Sal; Pureza por HPLC	<sup>1</sup> H NMR
	A13 [C <sub>28</sub> H <sub>36</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> +H ] <sup>+</sup> 489,3; 489,4 TFA sal; 98,2% a 254 nm	(400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) δ ppm 8,18 (s, 1H), 7,48-7,36 (m, 3H), 5,52 (s, 1H), 4,23-4,10 (m, 1H), 3,65-3,57 (m, 2H), 2,93-2,75 (m, 2H), 2,46 (s, 3H), 2,31-2,21 (m, 2H), 2,20-2,11 (m, 3H), 2,06-1,89 (m, 2H), 1,89-1,50 (m, 6H), 1,37 (s, ,3H), 0,87-0,79 (m, 2H), 0,68-0,56 (m, 2H).

Exemplo B: Teste de Inibição da TTK

[00100] TTK ativa foi adquirida na Invitrogen como uma fusão GST amino terminal de TTK humana de comprimento total. Amino terminal 6 histidina, TTK humana sumo etiquetada (resíduos 1-275) foi expressada em *E. coli*, e purificada até >95% de homogeneidade por agarose Ni<sup>2+</sup>, filtração por gel, e cromatografia de permuta iônica.

[00101] A atividade da TTK foi medida usando um sistema de detecção por ELISA indireto. GST-TTK (0,68 nM) foi incubada na presença de ou 16 µM de ATP (Sigma no. do cat. A7699) ou 100 µM de ATP, 50 mM de Hepes pH 7,2, 1 mM de EGTA, 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, e 0,1% de Pluronic em uma placa de microtítulo de 96 cavidades pré-revestida com amino terminal 6 histidina, TTK sumo etiquetada (resíduos aminoácido 1 a 275).

[00102] A reação foi deixada para prosseguir por 30 minutos, seguidos por 5 lavagens da placa com tampão de lavagem (*Wash*

*Buffer*, salina tamponada com fosfato suplementada com 0,2% de Tween 20), e incubação por 30 minutos com uma diluição a 1:3000 de anticorpo primário (Cell Signaling no. de cat. 9381). A placa foi lavada 5 vezes com tampão de lavagem (*Wash Buffer*), incubada por 30 minutos na presença de anticorpo secundário acoplado à peroxidase de raiz forte (BioRad no. de cat. 1721019, concentração de 1:3000), lavada um adicional de 5 vezes com tampão de lavagem, e incubada na presença de substrato de TMB (Sigma no. de cat. T0440). A reação colorimétrica foi deixada para continuar por 5 minutos, seguidos por adição de solução de interrupção (*stop solution*, 0,5 N de ácido sulfúrico), e quantificada por detecção a 450 nm com ou uma leitura de placa à base de filtro ou monocromática (Beckman DTX880 ou Molecular Devices M5, respectivamente).

[00103] A inibição dos compostos foi determinada ou em uma concentração fixa (10 µM) ou em uma concentração de inibidor variável (tipicamente 0,5 µM a 0,001 µM em uma titulação de resposta de dose de 10 pontos). Os compostos foram pré-incubados na presença de enzima por 5 minutos antes de adição de ATP e a atividade remanescente foi quantificada usando o teste de atividade acima descrito. A % de Inibição de um composto foi determinada usando a fórmula que se segue; % de Inibição =  $100 \times (1 - (\text{valor experimental} - \text{valor de fundo}) / (\text{alto controle de atividade} - \text{valor de fundo}))$ . O valor da IC<sub>50</sub> foi determinado usando um ajuste de curva logística de 4 pontos não linear (XLfit4, IDBS) com a fórmula;  $(A + (B / (1 + ((x/C)^D))))$ , onde A = valor de fundo, B = faixa, C = ponto de inflexão, D = parâmetro de ajuste de curva.

[00104] Na Tabela 1 abaixo, são proporcionadas faixas de valores de IC<sub>50</sub> para exemplos de compostos usando 100 µM de ATP. As faixas de IC<sub>50</sub> são indicadas como "A," "B," e "C," para valores menores do que ou iguais a 0,1 µM; os maiores de 0,1 µM e menores do que ou iguais a

0,5 µM; e os maiores do que 0,5 µM, respectivamente. Faixas de IC<sub>50</sub> denotadas com um asterisco indicaram que 16 µM de ATP (Sigma no. de cat. A7699) foram usados no teste.

Exemplo C: Dados de Linhagens de Células Cancerígenas sobre Exemplos de Compostos da Invenção

[00105] Células de câncer de mama (MDA-MB-468), células de câncer de cólon (HCT116) e células de câncer ovariano (OVCAR-3) foram semeadas (1000 a 4000 em 80 µl por cavidade dependendo da taxa de crescimento celular) em placas de 96 cavidades 24 horas antes da sobreposição do composto. Os compostos foram preparados como soluções de estoque a 10 mM em 100% de DMSO as quais foram diluídas com meio de crescimento celular DMEM (Meio de Eagle Modificado por Dulbecco) (Invitrogen, Burlington, ON, Canadá) contendo 10% de FBS (Soro Fetal Bovino) até concentrações variando de 50 nM a 250 µM. Alíquotas (20 µl) de cada concentração foram sobrepostas a 80 µl das células pré-semeadas nas placas de 96 cavidades para produzir concentrações finais de 10 nM a 50 µM. As células foram cultivadas por 5 dias antes de ser realizado o teste de Sulforrodamina B (SRB) para determinar a atividade de inibição do crescimento celular do composto.

[00106] Sulforrodamina B (adquirida da Sigma, Oakville, ON, Canadá) é um corante hidrossolúvel que liga aos aminoácidos básicos das proteínas celulares. Deste modo, medição colorimétrica do corante ligado proporciona uma estimativa da massa total de proteína que é relacionada com o número de células. As células são fixadas *in situ* aspirando delicadamente o meio de cultura e adicionando 50 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 10% gelado por cavidade e incubando a 4°C por 30 a 60 min, As placas são lavadas com H<sub>2</sub>O cinco vezes e deixadas para secar ao ar por 5 min. Adição de 50 µl de solução SRB a 0,4% (em peso / volume) em 1% (em v/v) de ácido acético a cada cavidade e

incubação por 30 min em temperatura ambiente completa a reação de coloração. Depois da coloração, as placas são lavadas quatro vezes com 1% de ácido acético para remover o corante não ligado e em seguida deixadas para secar ao ar por 5 min. O corante é solubilizado com 100 µl de Tris a 10 mM pH 10,5 por cavidade. A absorbância é lida a 570 nm.

[00107] A percentagem (%) de inibição do crescimento relativa foi calculada comparando células tratadas somente com DMSO (100%). As GI<sub>50</sub>'s foram determinadas para compostos com atividade citotóxica. A GI<sub>50</sub> foi calculada usando o software GraphPad PRISM (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA). GI<sub>50</sub> (inibição do crescimento) é a concentração de composto que causa 50% de inibição do crescimento celular.

[00108] Na Tabela 1 abaixo, são proporcionadas as faixas de valores de GI<sub>50</sub> para os exemplos de compostos contra linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-468), linhagens celulares de câncer de cólon (HCT116) e linhagens celulares de câncer ovariano (OVCAR-3). Os compostos de exemplo demonstraram atividade variável de inibição do crescimento / destruição celular contra células de câncer de mama, de câncer de cólon, e de câncer ovariano. As faixas de GI<sub>50</sub> são indicadas como "A," "B," e "C," para valores menores do que ou iguais a 0,1 µM; os maiores do que 0,1 µM e menores do que ou iguais a 0,5 µM; e os maiores do que 0,5 µM, respectivamente.

Exemplo D: Dados de Compostos de Exemplo sobre Células de Iniciação Tumoral de Câncer de Cólon e Ovariano

Materiais e Métodos: Frasco T-75 tratado com cultura de não tecido ou com cultura de tecido e placas de 96 cavidades foram adquiridos da VWR. Suplemento de vitamina B-27, MEM NEAA (meio mínimo essencial aminoácidos não essenciais), piruvato de sódio, L-glutamina, suplemento N2, penicilina-estreptomicina e fungizona / anfotericina B

foram obtidos da Invitrogen. A mistura de lipídeos, heparina e EGF foi adquirida da Sigma; bFGF da BD Biosciences. Células de Iniciação Tumoral (TICs) do colon foram mantidas rotineiramente usando frascos T-75 tratados com cultura de não tecido em meio DMEM:F12 contendo 0,2X suplemento B-27, 4 ug/ml de heparina, 1XMEM NEAA, 1X piruvato de sódio, 1 mM de glutamina, 10 pg/ul de bFGF, 20 pg/ul de EGF, 1X suplemento N2, mistura de lipídeos, penicilina-estreptomicina e fungizona / anfotericina B. TICs ovarianas foram mantidas rotineiramente usando frascos T-75 cultivados com tecido em meio DMEM:F12 contendo 1X suplemento B-27, 4 ug/ml de heparina, 20 pg/ul de bFGF, 20 pg/ul de EGF e penicilina-estreptomicina.

Protocolo do Teste: Os compostos descritos aqui, neste pedido de patente, foram dissolvidos em DMSO e posteriormente diluídos em meio de cultura celular para determinação da GI<sub>50</sub>. As TICs do colon foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 cavidades tratadas com cultura de não tecido com 4.000 células/cavidade. Depois de 24 h, o composto foi adicionado na cultura celular em diferentes concentrações, e a concentração final de DMSO foi ajustada para 0,1%. Em seguida as células foram cultivadas a 37°C por 9 dias. TICs ovarianas foram tripsinizadas e semeadas em placas de 96 cavidades tratadas com cultura de tecido com 1.000 células/cavidade. Depois de 24 h, o composto foi adicionado na cultura celular em diferentes concentrações, e a concentração final de DMSO foi ajustada para 0,1%. Em seguida as células foram cultivadas a 37°C por 6 dias. A viabilidade celular foi avaliada pelo teste Alamar Blue: 10 ul de Alamar Blue foram adicionados em cada cavidade. Depois de 4 horas de incubação a 37°C, a fluorescência foi registrada em excitação de 544 e emissão de 590. A GI<sub>50</sub> (Inibição do crescimento) foi calculada usando o software GraphPad Prism 4.0. Dados de inibição do crescimento celular para compostos descritos aqui, neste pedido de patente, são tabelados

abaixo.

[00109] Na Tabela 1 abaixo, são proporcionadas faixas de valores de GI<sub>50</sub> para exemplos de compostos contra TICs (Colon 12 e Ovariano 2393A). As faixas de GI<sub>50</sub> são indicadas como "A," "B," e "C," para valores de menos de ou igual a 0,1 µM; os maiores de 0,1 µM e menores do que ou iguais a 0,5 µM; e os maiores de 0,5 µM, respectivamente.

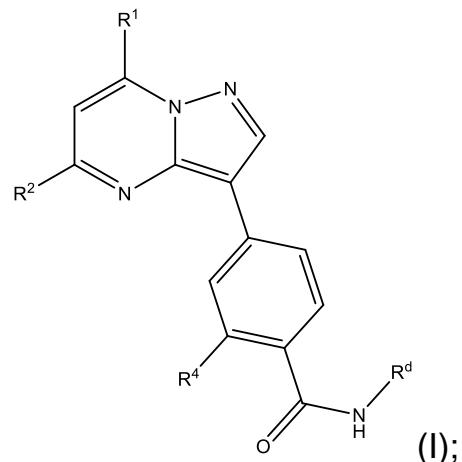
**Tabela 1:** Atividade *in vitro* dos Exemplos de Compostos

No. do Exemplo	TTK <b>IC<sub>50</sub></b> <b>Faixa</b>	Faixa de GI <sub>50</sub> da Linhagem Celular <b>Cancerígena</b>			Faixa de GI <sub>50</sub> da Célula de Iniciação <b>Tumoral</b>	
		MDA-MB- 468	HCT116	OVCAR-3	Ovariano 2393A	Cólon 12
A1	A	A	A	A	A	A
A2	A	A	A	A	ND	ND
A3	A	A	A	A	ND	ND
A4	A	A	A	A	A	ND
A5	A	A	A	B	ND	ND
A6	A	A	A	A	A	A
A8	A	B	B	C	ND	ND
A11	A	A	A	A	ND	ND
A12	A	A	A	A	ND	ND
A13	A	B	A	B	ND	ND

ND – não determinado

## REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte fórmula estrutural:



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em que:

$R^1$  é  $-NH-CH_2-Cy$ ,

$Cy$  é ciclopropil ou ciclobutil, em que o ciclopropil ou ciclobutil é opcionalmente substituído com um ou dois grupos selecionados entre alquila e hidroxila;

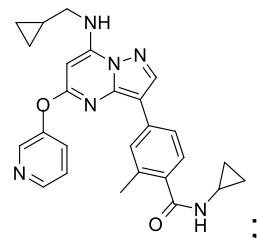
$R^2$  é -O-piridinila;  $-NH-(C_2-C_6)$ hidroxialquila opcionalmente substituída com ciclopropila ou isopropila; ou  $-NH-(C_3-C_6)$ cicloalquila opcionalmente substituída com hidroxila ou  $(C_1-C_2)$ hidroxilalquila;

$R^4$  é selecionado entre hidrogênio, halogênio, e  $(C_1-C_3)$ alquila; e

$R^d$  é ciclopropila.

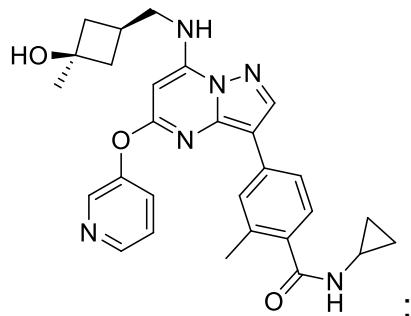
2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que  $R^4$  é cloro ou metila.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte fórmula estrutural:



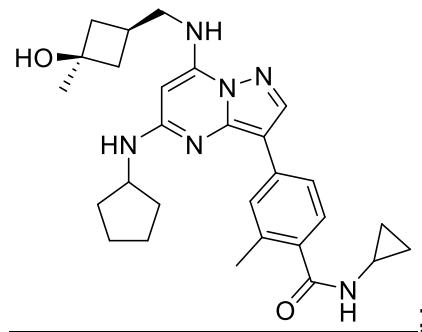
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

4. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte fórmula estrutural:



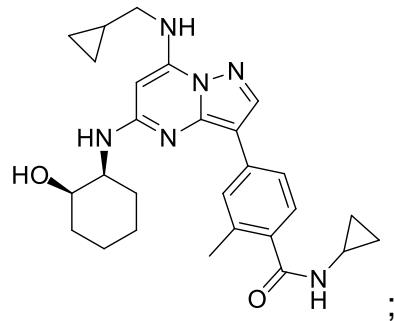
ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

5. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte fórmula estrutural:



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

6. Composto, de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que é representado pela seguinte fórmula estrutural:



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

7. Composição farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, e um veículo ou diluente farmaceuticamente

aceitável.

8. Uso de uma quantidade eficaz de um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou de uma composição farmacêutica, como definida na reivindicação 7, caracterizado pelo fato de que é para o preparo de um medicamento para tratamento do câncer.

9. Uso, de acordo com a reivindicação 8, caracterizado pelo fato de que o câncer é câncer pancreático, câncer de próstata, câncer pulmonar, melanoma, câncer de mama, câncer de cólon, ou câncer ovariano.