



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

(11) PI 0924183-3 B1



(22) Data do Depósito: 15/12/2009

(45) Data de Concessão: 17/12/2019

(54) Título: INIBIDORES DE CDK4/6 QUINASE, SEUS USOS E SUA FORMA CRISTALINA III, E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

(51) Int.Cl.: C07D 401/14; A61K 31/517; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 22/12/2008 EP 08 380343.7; 24/02/2009 US 61/154,954.

(73) Titular(es): ELI LILLY AND COMPANY.

(72) Inventor(es): DAVID ANDREWS COATES; ALFONSO DE DIOS MAGAÑA; ANA DE PRADO GONZALES; MIRIAM FILADELFIA DEL PRADO CATALINA; MARIA CRISTINA GARCIA PAREDES; LAWRENCE MARK GELBERT; JOHN MONTE KNOBELOCH; MARIA DOLORES MARTIN ORTEGA FINGER; JOSE ANTONIO MARTINEZ PEREZ; ANA ISABEL MATEO HERRANZ; CARLOS PEREZ MARTINEZ; CONCEPCION SANCHEZ MARTINEZ; EVA MARIA MARTIN DE LA NAVA.

(86) Pedido PCT: PCT US2009068030 de 15/12/2009

(87) Publicação PCT: WO 2010/075074 de 01/07/2010

(85) Data do Início da Fase Nacional: 22/06/2011

(57) Resumo: INIBIDORES DE CDK4/6 QUINASE, SEUS USOS E SUA FORMA CRISTALINA III, E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA A presente invenção se refere a um composto de Fórmula (I): ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, que é útil no tratamento de doenças proliferativas de célula.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para
"INIBIDORES DE CDK4/6 QUINASE, SEUS USOS E SUA FORMA CRISTALINA III, E FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA".

[0001] A presente invenção se refere a quinases dependentes de ciclina altamente homólogas (Cdks) CDK4 e CDK6 em combinação com Ciclina D são reguladores-chave da transição através do ponto de restrição R entre as fases G₁ (crescimento) e S (replicação de DNA) dos ciclos de célula. A CDK4/6 exerce seus efeitos via fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). Uma vez que fosforilatada, a pRb perde seu efeito inibitório na transcrição de genes que promovem entrada na fase S.

[0002] Por contraste, a inibição específica de atividade de quinase CDK4/6 pelo modulador de proteína endógena p16^{INK4} ou por inibidores de molécula pequena resulta na pRb hipofosforilatada e captura das células no ponto de restrição G₁. Como o mecanismo primário de regulação do ponto de restrição G₁, a trajetória regulada por estas quinases é alterada em um espectro amplo de tumores humanos e, desse modo, a inibição de CDK4/CDK6 nestes tumores tem benefício terapêutico por prevenção da divisão da célula.

[0003] Pim-1 é uma serina/treonina quinase que regula funções biológicas diversas, incluindo progressão de ciclo de célula, trajetórias de transdução transcricional/de sinal e apoptose e cuja expressão tenha sido ligada a vários cânceres, incluindo tumores hematológicos, de próstata e orais (Bachmann, M. and T. Moroy, Int. J. Biochem. Cell Biol., 2005. **37**(4): p. 726-30).

[0004] Os inibidores de quinase são conhecidos na técnica. WO 98/11095 descreve uma série de 2-pirimidinaminas substituídas e as descrevem, como inibidores de quinase, em particular as quinases p56^{lck}, ZAP-70 e proteína quinase C. WO 98/11095 não descreve inibição de Cdks.

[0005] Uma série de 2-(piridin-2-ilamino)-pirido [2,3-d] pirimidin-7-onas descrita como tendo atividade inibitória de CDK4/6 é descrita em WO 03/062236. Estes compostos são descritos como sendo úteis no tratamento de distúrbios proliferativos de célula tais como câncer e restenose. Contudo, os compostos são pobremente solúveis em solução aquosa e não mostram atividade inibitória apreciável em outras quinases-alvo (não Cdk).

[0006] Permanece uma necessidade de se proporcionar inibidores de CDK4/6 que possam ser usados no tratamento de distúrbios proliferativos de célula tal como câncer. A presente invenção proporciona inibidores de CDK4/6. Certos compostos da presente invenção são inibidores de CDK4/6 mais potentes do que certos compostos conhecidos na técnica.

[0007] Adicionalmente, há uma necessidade de se proporcionar inibidores de CDK4/6 que sejam seletivos para CDK4/6 comparados a outras CDKs e sejam, desse modo, capazes de produzir captura específica de G_1 quando presentes em concentrações farmacologicamente relevantes. A presente invenção proporciona inibidores de CDK4/6 que são capazes de produzir captura específica de G_1 quando presentes em concentrações farmacologicamente relevantes.

[0008] Permanece também uma necessidade de se proporcionar inibidores de CDK4/6 com solubilidade aperfeiçoada em solução aquosa. Certos compostos da presente invenção têm solubilidade aperfeiçoada em solução aquosa comparada com certos compostos na técnica.

[0009] Adicionalmente, há uma necessidade de se proporcionar inibidores de CDK4/6 que tenham distribuição aperfeiçoada no tecido cerebral e possam, desse modo, ser usados para tratar distúrbios que ocorrem dentro do cérebro, por exemplo, tumores de cérebro primários

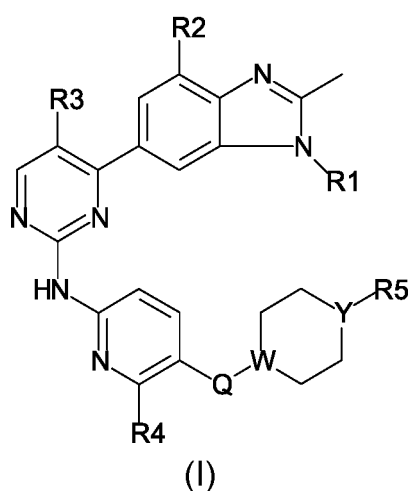
e metastáticos. Certos compostos da presente invenção têm distribuição aperfeiçoada no tecido cerebral.

[00010] Há também uma necessidade de se proporcionar inibidores de CDK4/6 com boas propriedades cinéticas tais como disponibilidade oral. Certos compostos da presente invenção têm disponibilidade oral aperfeiçoada quando comparados com certos compostos conhecidos na técnica.

[00011] Em adição, há uma necessidade de se proporcionar inibidores de quinase que apresentam atividade inibitória secundária em outras quinases não CDK, por exemplo, quinase Pim-1. Certos compostos da presente invenção apresentam atividade inibitória dupla de CDK4/6 e quinase Pim-1.

[00012] A presente invenção proporciona compostos da Fórmula:

Fórmula I



na qual

R1 é C₃-C₅ alquila, C₃-C₅ cicloalquila ou ciclopropil-metila;

R2 e R3 são H ou flúor, em que pelo menos um de R2, ou R3 é flúor;

R4 é H ou CH₃;

R5 é C₁-C₆ alquila ou -NR₆R₇, em que R6 e R7 são C₁-C₃ alquila;

Q é CH₂, O, S ou uma ligação direta; e

W e Y são C ou N, em que pelo menos um de W ou Y é N, e sendo que quando Q é O ou S, W é C;

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00013] A presente invenção proporciona uma formulação farmacêutica compreendendo um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[00014] A presente invenção proporciona um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para uso em terapia.

[00015] A presente invenção proporciona um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para uso no tratamento de câncer. Em particular aqueles cânceres selecionados a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, câncer de seio, câncer de pulmão, especialmente câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC), câncer de próstata, glioblastoma, linfoma de célula do manto (MCL), leucemia mieloide crônica (CML) e leucemia mieloide aguda (AML).

[00016] Esta invenção adicionalmente proporciona um método de tratamento de câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, câncer de seio, câncer de pulmão, especialmente câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC), câncer de próstata, glioblastoma, linfoma de célula do manto, leucemia mieloide crônica e leucemia mieloide aguda em um mamífero compreendendo administrar a um mamífero em necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00017] Adicionalmente, esta invenção proporciona o uso de um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo para a fabricação de um medicamento para o

tratamento de câncer. Em particular aqueles cânceres são selecionados a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, câncer de seio, câncer de pulmão, especialmente câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC), câncer de próstata, glioblastoma, linfoma de célula do manto, leucemia mieloide crônica e leucemia mieloide aguda.

[00018] Além disso, esta invenção proporciona uma formulação farmacêutica para uso em terapia compreendendo um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e o veículo, diluente, ou excipiente farmaceuticamente aceitável. A invenção também proporciona uma formulação farmacêutica para tratamento de câncer colorretal, câncer de seio, câncer de pulmão, especialmente câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC), câncer de próstata, glioblastoma, linfoma de célula do manto, leucemia mieloide crônica e leucemia mieloide aguda compreendendo um composto da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e o veículo, diluente, ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[00019] Os termos químicos gerais usados nas Fórmulas acima têm seus significados usuais. Por exemplo, o termo " C_3 - C_5 alquila" se refere a uma cadeia alifática reta ou ramificada, monovalente, saturada de três a cinco átomos de carbono e inclui, mas não é limitado a, *n*-propila, isopropila, *n*-butila, isobutila, *sec*-butila e *terc*-butila.

[00020] O termo C_3 - C_5 cicloalquila se refere a um sistema de anel de carbono saturado contendo três a cinco átomos de carbono.

[00021] Será compreendido pelo leitor versado que muitos ou todos os compostos da presente invenção são capazes de formar sais. Os compostos da presente invenção são aminas, e, conseqüentemente, reagem com qualquer de um número de ácidos inorgânicos e orgânicos para formarem sais de adição ácido farmaceuticamente

aceitáveis. Tais sais de adição ácido farmaceuticamente aceitáveis e metodologia comum para preparação dos mesmos são conhecidos na técnica. Vide, *por exemplo*, P. Stahl, *et al.*, HANDBOOK OF PHARMACEUTICAL SALTS: PROPERTIES, SELECTION AND USE, (VCHA/Wiley-VCH, 2002); L.D. Bighley, S.M. Berge, D.C. Monkhouse, in "Enciclopedia of Pharmaceutical Technology". Eds. J. Swarbrick e J.C. Boylan, Vol. 13, Marcel Dekker, Inc., New York, Basel, Hong Kong 1995, pp. 453-499; S.M. Berge, *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *Journal of Pharmaceutical Sciences*, Vol 66, No. 1, January 1977. O cloridrato e sais de mesilato são preferidos. O sal de mesilato é especialmente preferido.

[00022] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual R1 é isopropila, ciclopropila, ciclopentila ou ciclopropil-metila. Mais preferivelmente, R1 é isopropila.

[00023] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual R2 é flúor e R3 é hidrogênio. Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual R2 é hidrogênio e R3 é flúor. Mais preferivelmente, ambos R2 e R3 são flúor.

[00024] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual R4 é hidrogênio. Em uma alternativa, R4 é preferivelmente metila. Mais preferivelmente, R4 é hidrogênio.

[00025] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual R5 é C₁-C₃ alquila ou -NR₆R₇, no qual R6 e R7 são C₁-C₃ alquila. Mais preferivelmente, R6 e R7 são etila. Mais preferivelmente R5 é C₁-C₃ alquila. Mais preferivelmente R5 é etila.

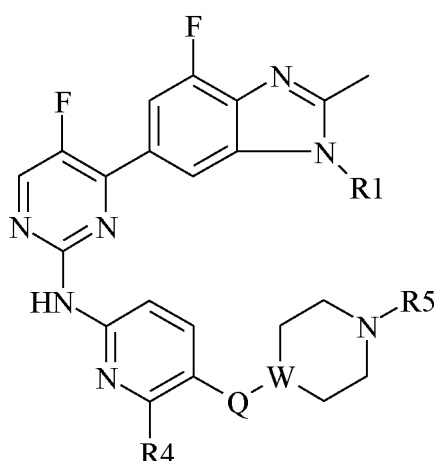
[00026] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual Q é CH₂ ou a ligação direta. Mais preferivelmente Q é CH₂.

[00027] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual Y é N.

[00028] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual W é N.

[00029] Preferivelmente a presente invenção compreende compostos de Fórmula I no qual ambos W e Y são N.

[00030] Compostos preferidos da invenção incluem aqueles da Fórmula:



Fórmula II

[00031] em que:

R1 é isopropila, ciclopropila, ciclopentila ou ciclopropilmetila;

R4 é H ou CH₃;

R5 é C₁-C₃ alquila;

Q é CH₂, O, ou uma ligação direta;

e

W é C ou N em que quando Q é O, W é C;

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00032] Especialmente preferidos são os compostos exemplificados aqui, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. Mais especialmente preferido é o composto [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-

il)-pirimidin-2-il]-amina, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo. [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina pode ser denominada na alternativa como 2-Pirimidinamina, *N*-[5-[(4-etil-1-piperazinil) metil]-2-piridinil]-5-fluoro-4-[4-fluoro-2-metil-1-(1-metiletil)-1H-benzimidazol-6-il]-.

[00033] Particularmente preferida é forma cristalina III de [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, caracterizada por um padrão de difração de pó de raios X (radiação de CuK α , λ = 1,54056 Å) compreendendo um pico a 21,29 ($2\theta \pm 0,1^\circ$) e, opcionalmente, um ou mais picos selecionados a partir do grupo compreendendo 11,54, 10,91, e 12,13 ($2\theta \pm 0,1^\circ$). Forma cristalina III de [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina pode ser adicionalmente caracterizada por um espectro de ^{13}C RMN tendo picos de alteração química $\nu(\text{F1})$ [ppm] a 112,7, 127,3 e 129,4.

[00034] Os compostos da presente invenção são inibidores específicos de CDK4 e CDK6 e são, portanto, úteis no tratamento de uma doença ou distúrbio caracterizado por proliferação de célula anormal. Em particular, os compostos da presente invenção são úteis no tratamento de câncer.

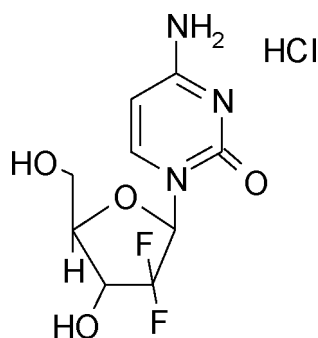
[00035] CDK4 e CDK6 modulam seus efeitos no ciclo de célula através da fosforilação de pRb. Os compostos da presente invenção, que são inibidores potentes de atividade de CDK4/6 e, desse modo, fosforilação de pRb, são esperados inibirem proliferação de célula (e, portanto, crescimento de tumor) em qualquer tipo de câncer onde as células estão proliferando e contêm um gene Rb1 funcional intacto (que codifica pRb). Os compostos da invenção são, portanto, úteis no tratamento de cânceres de pRb $^+$ tais como câncer colorretal, câncer de

seio, câncer de pulmão, câncer de próstata, leucemia mieloide crônica, leucemia mieloide aguda (Fry, D.W. *et al.* Mol. Cancer Ther. (2004), 3(11), 1427), linfoma de célula do manto (Marzec, M. *et al.*, Blood (2006), 108(5), 1744), câncer de ovário (Kim, T. M. *et al.*, Cancer Research (1994), 54, 605), câncer pancreático (Schutte, M. *et al.*, Cancer Research (1997), 57, 3126) melanoma maligno e melanoma maligno metastático (Maelandsmo, G.M. *et al.*, British Journal of Cancer (1996), 73, 909) em mamíferos. Os compostos da invenção são também esperados serem úteis no tratamento de rhabdomiosarcoma (Saab, R. *et al.*, Mol. Cancer Ther. (2006), 5(5), 1299) e mieloma múltiplo (Baughn, L.B. *et al.*, Cancer Res. (2006), 66(15), 7661) em mamíferos. É preferido que o mamífero a ser tratado seja um humano.

[00036] Adicionalmente, compostos preferidos da presente invenção exibem a propriedade vantajosa que eles têm distribuição aperfeiçoada no tecido do cérebro. Por exemplo, quando administrados em um modelo de rato, a proporção de exposição de cérebro:plasma do composto do exemplo 16 (determinada usando-se a área sob a curva (AUC) ou concentrações máximas de plasma e cérebro (C_{máx}), vide tabela 6c) é aproximadamente 1, indicando que o composto do exemplo 16 se distribui bem no cérebro. Em contraste, os presentes inventores determinaram que um composto preferido do WO 03/062236 (6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8H-pirido[2,3-d]pirimidin-7-ona) mostra proporções de distribuição de cérebro:plasma de 0,17 (AUC) e 0,1 (C_{máx}), indicando que o composto se distribui relativamente pobremente no tecido do cérebro neste modelo. Compostos preferidos da presente invenção são, portanto, capazes de penetrarem no cérebro e são, desse modo, úteis no tratamento de tumores de cérebro primários e metastáticos onde as células estão se proliferando e contêm um gene de Rb1

funcional, intacto. Exemplos de tais tumores de cérebro pRb⁺ incluem glioblastoma, bem como meduloblastoma e astrocitoma (Lee, W.-H. *et al.*, *Science* (1987), 235, 1394). Temozolomida é um agente de alquilação de DNA citotóxico usado para o tratamento de tumores de cérebro incluindo glioblastoma e astrocitoma (Friedman, H. S. *et al.* (2000), *Clin. Cancer Res.* 6(7): 2585-97), incluindo metástase de cérebro de melanoma, câncer de seio e NSCLC (Siena, S. *et al.* (2009) *Annals of Oncology*, doi:10.1093/annonc/mdp343). Temozolomida interage com DNA causando modificação/dano químico (Marchesi, F., *et al.* (2007), *Pharmacol. Res.* 56(4): 275-87). Os compostos da presente invenção podem ser usados em combinação com temozolomida para o tratamento de tumores de cérebro de pRb⁺ primários e metastáticos tais como glioblastoma e astrocitoma, por exemplo, onde tais metástases são derivadas de melanoma, câncer de seio ou NSCLC.

[00037] Gemcitabina HCl, um análogo de nucleosídeo que exibe atividade antitumor, é 2'-deóxi-2',2'-difluorocitidina monoclóridrato (β -isômero), também conhecido como 2',2'-difluoro-2'-deoxicitidina monoclóridrato, ou como 1-(4-amino-2-oxo-1H-pirimidin-1-il)-2-desóxi-2',2'-difluororibose. Gemcitabina HCl é descrito na Patente dos Estados Unidos 5.464.826. A Fórmula estrutural é representada abaixo:



[00038] Gemcitabina HCl é eficaz no tratamento de câncer de pulmão de célula não pequena (NSCLC) (Sandler, A. and Ettinger,

D.S., (1999), *The Oncologist*, 4, 241), câncer pancreático (Pino, S.M. *et al.*, (2004), *Current Gastroenterology Reports*, 6, 119), câncer de ovário (Pfisterer, J. *et al.*, (2006), *Journal of Clinical Oncology*, 24(29), 4699) e câncer de seio metastático (Chan, S., *et al.*, (2009), *Journal of Clinical Oncology*, 27(11), 1753). Os compostos da presente invenção podem ser usados em combinação com gemcitabina HCl para o tratamento de NSCLC, câncer pancreático, câncer de ovário e câncer de seio metastático.

[00039] Os compostos da presente invenção podem ser usados em um método de tratamento de câncer, em particular os cânceres descritos acima, em um mamífero compreendendo administrar a um mamífero em necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção. Em uma concretização preferida, os compostos da presente invenção podem ser usados em um método de tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, linfoma de célula do manto, câncer de seio, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão, especialmente NSCLC. Em outra concretização preferida, os compostos da presente invenção podem ser usados em um método de tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão. Em outra concretização preferida, um composto da presente invenção pode ser usado em um método de tratamento de glioblastoma ou astrocitoma em um mamífero, compreendendo administrar a um mamífero em necessidade do mesmo uma combinação terapeuticamente eficaz de um composto da invenção e temozolomida. Em outra concretização preferida, um composto da invenção pode ser usado em um método de tratamento de NSCLC, câncer pancreático, câncer de ovário ou câncer metastático de seio em um mamífero, compreendendo administrar a um mamífero em

necessidade deste uma combinação terapeuticamente eficaz de um composto da invenção e gemcitabina HCl.

[00040] Os compostos da presente invenção podem ser usados para o tratamento de câncer, em particular os cânceres descritos acima. Em uma concretização preferida, os compostos da presente invenção podem ser usados para o tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, linfoma de célula do manto, câncer de seio, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão, especialmente NSCLC. Em outra concretização preferida, os compostos da presente invenção podem ser usados para o tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão. Em outra concretização preferida, a invenção proporciona um composto da presente invenção para uso em combinação simultânea, separada ou sequencial com temozolomida no tratamento de glioblastoma ou astrocitoma. Em outra concretização preferida, a invenção proporciona um composto da presente invenção para uso em combinação simultânea, separada ou sequencial com gemcitabina HCl no tratamento de NSCLC, câncer pancreático, câncer de ovário ou câncer metastático de seio.

[00041] Além disso, os compostos da presente invenção podem ser usados na fabricação de um medicamento para o tratamento de câncer, em particular os cânceres descritos acima. Em uma concretização preferida, os compostos da presente invenção podem ser usados na fabricação de um medicamento para o tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, linfoma de célula do manto, câncer de seio, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão, especialmente NSCLC. Em outra concretização preferida, os compostos da presente invenção podem ser usados na fabricação de um medicamento para o

tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão. Em outra concretização preferida, a invenção proporciona o uso de um composto da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de glioblastoma ou astrocitoma, no qual o medicamento também compreende temozolomida ou é para ser administrado simultaneamente, separadamente ou sequencialmente com temozolomida. Em outra concretização preferida, a invenção proporciona o uso de um composto da invenção na fabricação de um medicamento para o tratamento de NSCLC, câncer pancreático, câncer de ovário ou câncer metastático de seio, em que o medicamento também compreende gemcitabina HCl ou é para ser administrado simultaneamente, separadamente ou sequencialmente com gemcitabina HCl.

[00042] É também provida uma formulação farmacêutica para tratamento de câncer, em particular os cânceres descritos acima compreendendo um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma concretização preferida, é também provida uma formulação farmacêutica para tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, linfoma de célula do manto, câncer de seio, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão, especialmente NSCLC, compreendendo um composto da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável deste junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Em uma concretização preferida, é também provida uma formulação farmacêutica para tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, glioblastoma, leucemia mieloide aguda e câncer de pulmão, compreendendo um composto da presente invenção ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Em outra concretização preferida, a invenção proporciona uma formulação farmacêutica para tratamento de glioblastoma ou astrocitoma, compreendendo um composto da invenção e temozolomida, junto com um veículo farmaceuticamente aceitável. Em outra concretização preferida, a invenção proporciona uma formulação farmacêutica para tratamento de NSCLC, câncer pancreático, câncer de ovário ou câncer metastático de seio, compreendendo um composto da invenção e gemcitabina HCl, junto com um veículo farmaceuticamente aceitável.

[00043] A invenção também proporciona uma formulação farmacêutica, compreendendo um composto da invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável deste e temozolomida, junto com um veículo, diluente, ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[00044] A invenção também proporciona uma formulação farmacêutica, compreendendo um composto da invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e gemcitabina HCl, junto com um veículo, diluente, ou excipiente farmaceuticamente aceitável.

[00045] A invenção adicionalmente proporciona uma formulação farmacêutica compreendendo um composto da invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável deste junto com um veículo farmaceuticamente aceitável e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos.

[00046] Adicionalmente, compostos exemplificados preferidos são também inibidores de Pim-1. Conforme notado acima, Pim-1 é uma serina/treonina quinase que é envolvida na regulação de diversas funções biológicas, incluindo progressão de ciclo de célula, trajetórias de transdução transcricional/de sinal e apoptose, e cuja expressão tenha sido ligada a vários cânceres. Em particular, a inibição de Pim-1 por inibidor de molécula pequena K00135 foi mostrada prejudicar a

sobrevivência e crescimento clonogênico de um painel de células de leucemia aguda humanas (Pogacic, V., *et al.*, Cancer Res. (2007). **67**(14): p. 6916-24). Em adição, Pim-1 tem mostrado ser expresso na neoíntima de artérias carótidas de rato danificadas por balão e em aortas torácicas humanas e artérias coronárias mostrando espessamento íntimo. Adicionalmente, inibição específica de função de Pim-1 suprime marcadamente ambas a formação de neoíntima após dano por balão e também a proliferação de células de músculo liso vasculares cultivadas (VSMCs), sugerindo que Pim-1 desempenha um papel crucial na proliferação de tais células. A proliferação de VSMCs foi implicada na patogênese de doenças vasculares oclusivas tais como aterosclerose e restenose e, portanto, inibição de Pim-1 é esperada suprimir proliferação de VSMC e, desse modo, serem úteis para o tratamento de doenças vasculares oclusivas (Katakami N., *et al.*, JBC (2004), 279(52), 54742-54749).

[00047] Consequentemente, compostos preferidos da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos, podem ser usados em um método de tratamento de doença vascular oclusiva tal como aterosclerose ou restenose em um mamífero, compreendendo administrar a um mamífero em necessidade de tal tratamento uma quantidade eficaz de um composto da presente invenção. Compostos preferidos da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos, podem ser usados no tratamento de doença vascular oclusiva tal como aterosclerose ou restenose. Além disso, compostos preferidos da presente invenção, ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos, podem ser usados na fabricação de um medicamento para o tratamento de doença vascular oclusiva tal como aterosclerose ou restenose. É também provida uma formulação farmacêutica para tratamento de doença vascular oclusiva tal como aterosclerose ou restenose,

compreendendo um composto preferido da presente invenção ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[00048] Conforme aqui usado, 'h' se refere a hora ou horas, 'min' se refere a minuto ou minutos, 'Cdk' se refere a quinase dependente de ciclina, 'pRb' se refere a proteína retinoblastoma, 'MCL' se refere a linfoma de célula de invólucro, 'AML' se refere a leucemia mieloide aguda, 'CML' se refere a leucemia mieloide crônica, 'Boc' se refere a N-terc-butoxicarbonila, 'EA' se refere a acetato de etila, 'DCM' se refere a diclorometano, 'DMSO' se refere a dimetilsulfóxido, 'DMA' se refere a dimetilacetamida, 'THF' se refere a tetra-hidrofuran, 'MtBE' se refere a metil terc-butil éter, 'TEA' se refere a trietilamina, 'FBS' se refere a soro bovino fetal, 'PBS' se refere a salina tamponada por fosfato, 'BSA' se refere a albumina de soro bovino, 'TA' se refere a temperatura ambiente, 'mpk' significa miligramas por kilograma, 'po' se refere a por os (oral), 'qd' significa dosagem uma vez por dia, 'HPLC' significa cromatografia líquida de alta pressão, 'q2d' significa uma dose única de 2 em 2 dias, 'q2dx10' significa uma dose única de 2 em 2 dias 10 vezes, 'VSMC' se refere a célula de músculo liso vascular e 'XRD' se refere a difração de raios X.

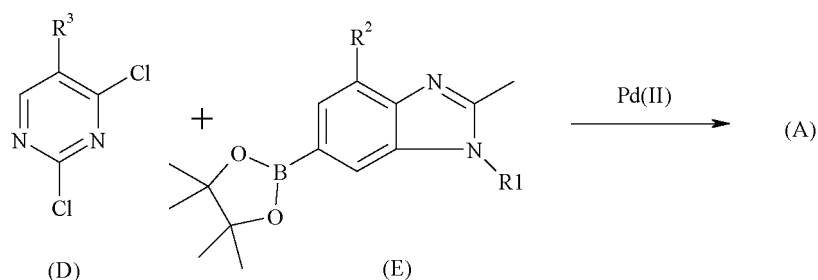
[00049] Os compostos de Fórmula I podem ser preparados por um versado na técnica seguindo técnicas e procedimentos reconhecidos. Mais especificamente, os compostos de Fórmula I podem ser preparados conforme colocado nos esquemas, métodos, e exemplos colocados abaixo. Será reconhecido por um técnico no assunto que as etapas individuais nos esquemas seguintes podem ser variadas para proporcionar os compostos de Fórmula I. Os reagentes e materiais de partida são prontamente disponíveis a um técnico no assunto. Todos os substituintes, a menos que de outro modo especificado, são conforme anteriormente definidos.

[00050] Os nomes do composto das seguintes preparações e

[00054] Na reação inferior do esquema 1 e quando Y-Z é N-terc-butoxicarbonil (Boc), um pirimidinil haleto (A) é também acoplado com uma piridinil amina (B), mas o grupo Boc é removido em ácido forte para produzir a amina livre (C). Finalmente, a amina (C) é alquilada sob condições de redução para produzir os compostos de Fórmula I.

Esquema 2

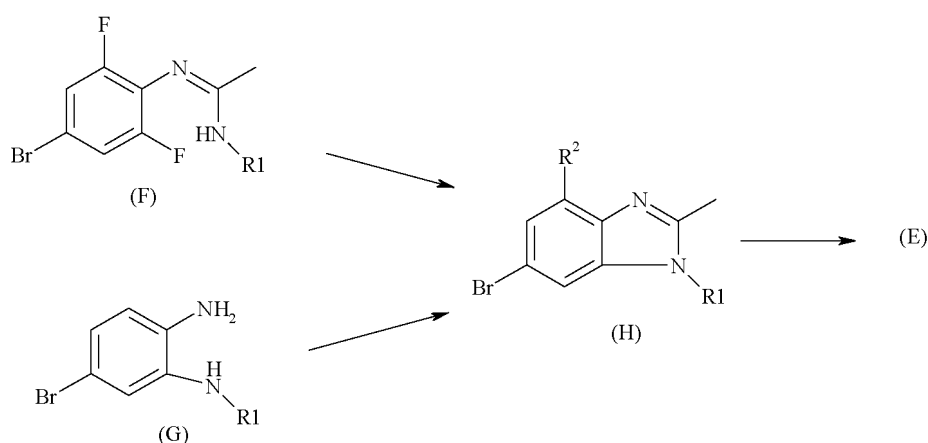
[00055] Preparação de pirimidinil-benzimidazóis (A)



[00056] Pirimidinil-benzimidazóis (A) são preparados por reações de acoplamento catalisadas por paládio (II) de dicloretos de pirimidinila comercialmente disponíveis (D) e benzimidazole boronatos (E).

Esquema 3

[00057] Preparação de boronatos de benzimidazol (E)



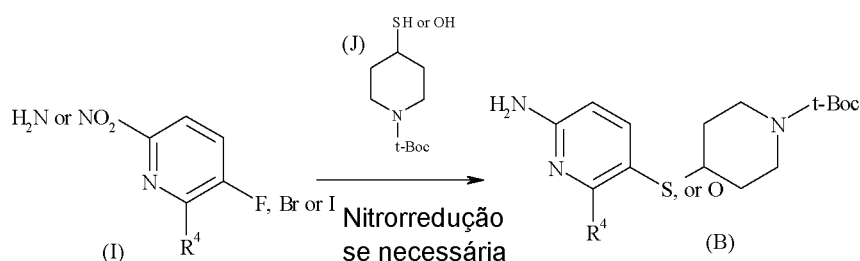
[00058] Boronatos de benzimidazol (E) são preparados via boromilação catalisada por Pd (II) do brometo em benzimidazóis (H) com bis (pinacolato) diboro. Benzimidazóis (H), por sua vez, são preparados por ciclização das amidinas (F) com potássio t-butoxido ou condensação das benzenodiaminas (G) com trietilortoacetato/ácido acético.

[00059] Amidinas (F) são preparadas conforme é conhecido por um versado na técnica de síntese orgânica por condensação de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina com o derivado de mono-acetamida de aminas R^1-NH_2 na presença de cloreto de fosforil. Benzenodiaminas (G) são preparadas em duas etapas conforme é conhecido por um versado na técnica de síntese orgânica por deslocamento do bromo de posição 2 em 2,4-dibromo-nitrobenzeno por aminas R^1-NH_2 seguido por redução do grupo nitro a um grupo amina.

Esquema 4

[00060] Preparação de piridinil aminas (B),

Onde Q é S ou O e W é C

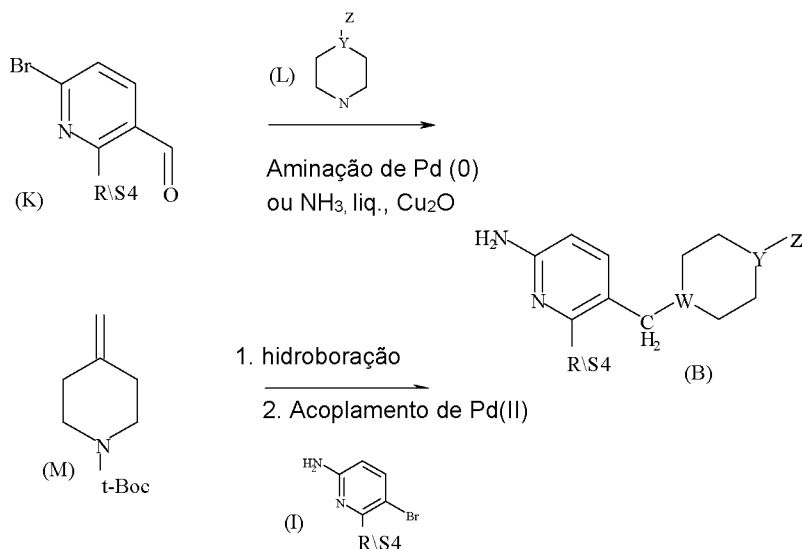


[00061] A síntese de piridinil amina (B) onde Q é S ou O e W é C é alcançada por deslocamento de um 5-haleto em piridina (I) por tiol ou álcool (J) comercialmente disponível. Se uma nitropiridina (I) é necessária, o produto de deslocamento adicionalmente suporta uma etapa de nitro redução para produzir (B). Deve ser notado que os compostos (I) são reagentes versáteis através de todos estes esquemas, mas somente alguns são comercialmente disponíveis como piridil aminas e alguns como nitropiridinas. Os comercialmente disponíveis (I) são, não obstante, conversíveis via reações de oxidação de amina ou nitro redução conhecidas na técnica para as sequências descritas aqui e abaixo.

Esquema 5

[00062] Preparação de piridinil aminas (B),

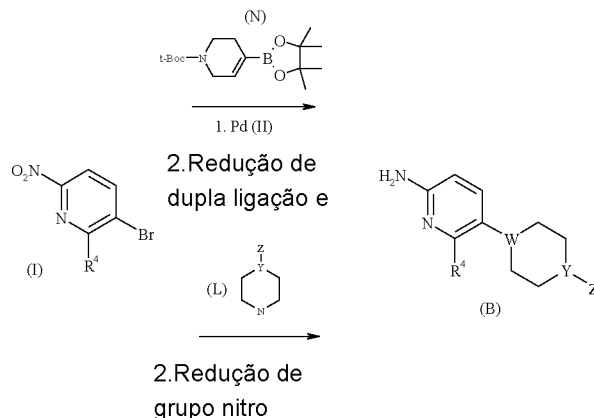
Onde Q é CH_2



[00063] A síntese de piridinil amins (B) onde Q é CH₂ é alcançada de dois modos: 1) Os carbaldeídos comercialmente disponíveis (K) suportam aminação redutiva com a amina livre (L), seguido por substituição do brometo de piridina por aminação catalisada por Pd (0) com lítio 1,1,1,3,3,3-hexametil-disilazano ou amônia líquida e óxido cuproso. 2) Ácido 1-piperidinacarboxílico comercialmente disponível, 4-metileno-, 1,1-dimetiletil éster (M) suportam hidroboração seguido por acoplamento de Pd (II) com piridil amina (I).

Esquema 6

[00064] Preparação de piridinil amins (B),
Onde Q é uma ligação direta



[00065] A síntese de piridinil amins (B) onde Q é uma ligação direta é alcançada de dois modos: 1) Ácido 1(2H)-piridinacarboxílico comercialmente disponível, 3,6-di-hidro-4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-dioxaborolan-2-il)-, 1,1-dimetiletil éster (N) suportam acoplamento de paládio (II) com nitropiridina (I) seguido por redução de ambos o grupo nitro e dupla ligação. 2) O brometo em nitropiridina (I) é deslocado por amina livre (L), seguida por redução de grupo nitro.

Preparação 1

terc-butil éster de ácido 4-(6-Amino-piridin-3-ilsulfanil)-piperidina-1-carboxílico

[00066] Adicionar tolueno seco (6,06 mL) a uma mistura de 2,9-dimetil-1,10-fenantrolina (76,52 mg), cobre (I) iodo (69,27 mg), terc-butóxido de sódio (475,59 mg), terc-butil éster de ácido 4-mercapto-piperidina-1-carboxílico (583,5 mg), magnésio (49,10 mg) e 2-amino-5-iodopiridina (550 mg). Borbulhar nitrogênio na mistura com ultrassom e agitar a suspensão a 110 °C em um tubo vedado por 24 horas. Resfriar e filtrar através de celite. Lavar com tolueno e remover o solvente sob vácuo. Adicionar hexano/EA (1/1) e filtrar através de uma almofada de celite/sílica-gel, lavando duas vezes com hexano/EA (1/1) e, em seguida, EA. Remover o solvente sob vácuo. Purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com hexano/ EA (50-75%) para proporcionar 630 mg do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 310 (M+H)⁺

Preparação 2

5-Fluoro-2-nitro-piridina

[00067] Ao ácido sulfúrico (46 mL) a 0 °C adicionar peróxido de hidrogênio 25% (26,98 mL) no ar aberto. Após 5 min adicionar uma solução fria de 2-amino-5-fluoro piridina (9 g) em ácido sulfúrico concentrado (46 mL) gota a gota com um funil de adição. Agitar a solução escura resultante a 0 °C à TA no banho durante a noite.

Derramar sobre 200 mL de água gelada e extrair com DCM. Lavar camadas orgânicas combinadas com solução aquosa 5% de bissulfito de sódio e secar sobre sulfato de sódio anidro. Remover o solvente sob vácuo e purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM para proporcionar 7,5 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 143 (M+H)⁺.

[00068] Preparar o seguinte essencialmente conforme descrito para 5-fluoro-2-nitro-piridina usando a amina correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
3	3-Bromo-2-metil-6-nitro-piridina	218

Preparação 4

1-Isopropil-4-(2-metil-6-nitro-piridin-3-il)-piperazina

[00069] Agitar 3-bromo-2-metil-6-nitro-piridina (2,46 g), 1-isopropil-piperazina (2,74 g), tetra-n-butil iodeto de amônia (418,69 mg) e carbonato de potássio (1,72 g) em dimetil sulfóxido (DMSO, 20 mL) a 65 °C durante a noite. Adicionar EA e água, separar as fases e secar a camada orgânica sobre sulfato de magnésio e remover o solvente sob vácuo. Purificar por cartucho de troca de cátion forte eluindo com metanol e, em seguida, metanol-NH₃ 2 N para proporcionar 2,58 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 265 (M+H)⁺

[00070] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para 1-isopropil-4-(2-metil-6-nitro-piridin-3-il)-piperazina usando o derivado de bromo correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
5	terc-butil éster de ácido (2'-Metil-6'-nitro-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbâmico	337
6	terc-butil éster de ácido (6'-Nitro-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbâmico	323

Preparação 7

5-(4-Isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-ilamina

[00071] Agitar 1-isopropil-4-(2-metil-6-nitro-piridin-3-il)-piperazina (2,52 g) e paládio sobre carbono 10% (600 mg) em metanol (38 mL) e EA (38 mL) sob H₂ (balão) durante a noite. Filtrar sobre um almofada de celite e remover o solvente sob vácuo. Purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM/metanol (0-10%) para proporcionar 2,23 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 143 (M+H)⁺.

[00072] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para 5-(4-isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-ilamina usando o derivado nitro correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
8	terc-butil éster de ácido (6'-Amino-2'-metil-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbâmico	307
9	terc-butil éster de ácido (6'-Amino-3,4,5,6-tetrahidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il)-carbâmico	293

Preparação 10

terc-butil éster de ácido 4-(6-Nitro-piridin-3-ilóxi)-piperidina-1-carboxílico

[00073] Adicionar terc-butóxido de potássio (4,84 g) a uma solução de 4-hidróxi-1-piperidina-carboxilato de terc-butila (8,76 g) em dimetilacetamida (DMA, 39 mL) a 0 °C sob nitrogênio. Agitar por 1 h e adicionar gota a gota a solução 5-fluoro-2-nitro-piridina (5 g) em DMA (78 mL). Deixar a reação agitar à TA durante a noite. Adicionar água e repousar por 1 h. Filtrar, lavar com água. Purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM/ EA (0-15%) para proporcionar 5,65 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 324 (M+H)⁺.

Preparação 11

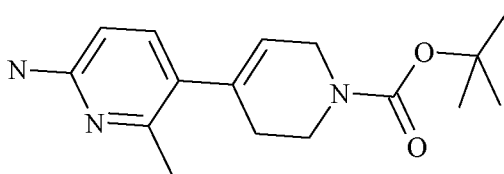
terc-butil éster de ácido 4-(6-Amino-piridin-3-ilóxi)-piperidina-1-carboxílico

[00074] Adicionar paládio sobre carbono 10% (0,6 g) a uma suspensão de terc-butil éster de ácido 4-(6-nitro-piridin-3-ilóxi)-

piperidina-1-carboxílico (5,65 g) em uma mistura de tetra-hidrofurano (THF)/metanol (30/30 mL/mL). Hidrogenar em um aparelho de Parr a 2 atm durante a noite. Filtrar através de uma almofada de celite, lavar com DCM e metanol. Purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM/metanol (10%)/ amônia (1%) para proporcionar 5 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 294 (M+H)⁺.

Preparação 12

terc-butil éster de ácido 6-Amino-2-metil-3',6'-dihidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico



[00075] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de terc-butil éster de ácido 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-3,6-di-hidro-2H-piridina-1-carboxílico (2,46 g) e 5-bromo-6-metil-piridin-2-ilamina (1,49 g) em 1,4-dioxano (31,82 mL) por 5 min, em seguida adicionar fosfato de potássio tri básico N-hidrato (5,07 g), acetato de paládio (35,72 mg), diciclo-hexil-(2',6'-dimetóxi-bifenil-2-il)-fosfano (134,69 mg)], água (7,96 mL) e agitar a 90 °C por 3 h. Diluir com DCM e lavar com água. Secar sobre sulfato de sódio e remover o solvente sob vácuo. Purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM/etanol 5%/NH₃ 0,1%, seguido por cartucho de troca de cátion forte (SCX) eluindo com metanol e, em seguida, metanol-NH₃ 2 M para proporcionar 2,12 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 292 (M+H)⁺.

Preparação 13

terc-butil éster de ácido 6-Amino-2-metil-3',4',5',6'-tetra-hidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico

[00076] Agitar uma mistura de terc-butil éster de ácido 6-amino-2-metil-3',6'-di-hidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico (2,12 g) e paládio em carbono 10% úmido (330 mg) em metanol (29,30 mL) sob H₂

(310,26 kPa (45 psi)) por 48 h. Filtrar sobre uma almofada de celite e remover o solvente sob vácuo para proporcionar 2,07 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 292 (M+H)⁺.

Preparação 14

terc-butil éster de ácido 6-nitro-3',6'-di-hidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico

[00077] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de terc-butil éster de ácido 4-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-3,6-di-hidro-2H-piridina-1-carboxílico (19,6 g), 5-bromo-2-nitropiridina (12,87 g), carbonato de sódio a 2M em água (63,39 mL) e cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio(II) (4,45 g) em 1,4-dioxano (316,94 mL) por 5 min e agitar a 80 °C por 5 h. Diluir com DCM e lavar com água. Secar sobre sulfato de magnésio e remover o solvente sob vácuo. Purificar por cromatografia de sílica-gel eluindo com DCM/ EA (0-40%) para proporcionar 8,72 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 306 (M+H)⁺.

Preparação 15

terc-butil éster de ácido 6-Amino-3',4',5',6'-tetra-hidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico

[00078] Dissolver terc-butil éster de ácido 6-nitro-3',6'-di-hidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico (1,89 g) em etanol (123,80 mL). Hidrogenar com paládio em carbono (H-Cube instrument, 7000 kPa (70 bar), 50 °C, 1 mL/min) para proporcionar 1,72 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 278 (M+H)⁺.

Preparação 16

terc-butil éster de ácido 4-(6-Amino-piridin-3-ilmetil)-piperidina-1-carboxílico

[00079] Agitar por 5 min terc-butil éster de ácido 4-metilenopiperidina-1-carboxílico (5,10 g) sob nitrogênio e adicionar uma solução de THF 0,5 M de 9-borabicyclo[3.3.1]nonano (77,49 mL). Agitar a 75 °C sob nitrogênio por 1 h. Resfriar e adicionar 2-amino-5-

bromopiridina (3,8 g), carbonato de potássio (3,87 g), e cloreto de 1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno)paládio(II) (538,10 mg) e uma mistura desgaseificada de DMF (47,83 mL) e água (4,78 mL). Agitar a 60 °C durante 4 horas, em seguida à TA durante o final de semana. Adicionar água e EA. Separar e extrair a camada aquosa com EA. Combinar as camadas orgânicas e secar sobre sulfato de sódio e remover o solvente sob vácuo. Purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel, eluindo com DCM/metanol (1%)/amônia (0,1%) para DCM/ metanol (3%)/amônia (0,3%). Triturar o resíduo com EA para proporcionar 1,85 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 292 (M+H)⁺.

[00080] Preparar o seguinte essencialmente conforme descrito para terc-butil éster de ácido 4-(6-amino-piridin-3-ilmetil)-piperidina-1-carboxílico usando o derivado de bromo correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
17	terc-butil éster de ácido 4-(6-Amino-2-metil-piridin-3-ilmetil)-piperidina-1-carboxílico	306

Preparação 18

1-(6-Bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina

[00081] Adicionar 1-etilpiperazina (221,44 mL) a uma mistura de 6-bromo-piridina-3-carbaldeído (300 g) e DCM (5000 mL). Em seguida, adicionar sódio triacetoxiboro-hidreto (372,09 g) em porções e agitar à TA por 12 h. Adicionar DCM (1000 mL) e solução aquosa de hidróxido de sódio 2 N (1500 mL). Separar as camadas e extrair duas vezes a camada aquosa com DCM (600 mL). Combinar a camada orgânicas e remover o solvente sob vácuo, adicionar EA e evaporar para proporcionar 451,3 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 285 (M+H)⁺.

[00082] Preparar o seguinte essencialmente conforme descrito para 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina usando a amina correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
19	terc-butil éster de ácido 4-(6-Bromo-piridin-3-ilmetil)-piperazina-1-carboxílico	357

Preparação 20

5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina

[00083] Adicionar lítio 1,1,1,3,3,3-hexametil-disilazano (1055 mL) vagarosamente a uma mistura desgaseificada de 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina (250 g), diciclo-hexilfosfino)bifenil (18,50 g), tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio (24,17 g) e THF (250 mL) a 50 °C. Aquecer a mistura a 65 °C durante a noite. Resfriar a 37 °C e adicionar água (500 mL). Remover metade do solvente sob vácuo e adicionar DCM (2,5 L). Filtrar sobre uma almofada de celite e remover parte do solvente. Adicionar metanol (300 mL) e metil terc-butil éter (MtBE, 600 mL) à mistura e resfriar em um banho de gelo. Em seguida, adicionar ácido clorídrico 2 M em etil éter (800 mL) e a solução aquosa 32% de ácido clorídrico (100 mL). Remover a camada orgânica, e adicionar uma solução aquosa de hidróxido de sódio a 2 M (2500 mL). Extrair a fase aquosa três vezes com DCM e remover o solvente sob vácuo. Solver em 90 mL de tolueno a 50 °C até dissolução completa e, em seguida, adicionar 80 mL de MtBE. Agitar durante a noite a TA. Adicionar MtBE adicional (100 mL) para precipitação completa. Filtrar o sólido e secar para proporcionar 108,24 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 221 (M+H)⁺.

[00084] Preparar o seguinte essencialmente conforme descrito para 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina usando o derivado de 2-bromo-piridina correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
21	terc-butil éster de ácido 4-(6-Amino-piridin-3-ilmetil)-piperazina-1-carboxílico	293

Preparação 22

2,4-Dibromo-1-nitro-benzeno

[00085] Adicionar gota a gota ácido nítrico fumegante (101,40 mL) a uma solução de 1,3-dibromo benzeno (102,51 mL) em ácido sulfúrico concentrado (322,79 mL) e água (62,39 mL) a 0 °C. Aquecer à TA e agitar por 12 h. Derramar a reação em gelo-água (1500 mL). Filtrar o sólido amarelo resultante sob vácuo e secar para proporcionar 178,46 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 281 (M+H)⁺.

Preparação 23

(5-Bromo-2-nitro-fenil)-ciclopentil-amina

[00086] Adicionar ciclopentanamina (32 mL) a uma solução de 2,4-dibromo-1-nitro-benzeno

[00087] (20 g) em 1-butanol (160 mL). Aquecer a mistura a 100 °C durante a noite. Remover o solvente sob vácuo, adicionar água e extrair com EA. Lavar a camada orgânica sequencialmente com uma solução saturada aquosa de bicarbonato de sódio e, em seguida, água. Secar sobre sulfato de magnésio e remover o solvente sob vácuo para proporcionar 22 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 286 (M+H)⁺.

Preparação 24

4-Bromo-N2-ciclopentil-benzeno-1,2-diamina

[00088] Adicionar ditioneto de sódio (107,47 g) a uma solução de 5-bromo-2-nitro-fenil)-ciclopentil-amina (22 g), THF (150 mL), água (150 mL) e hidróxido de amônia (30 mL). Agitar a mistura à TA durante a noite. Extrair duas vezes com EA, secar sobre sulfato de magnésio e remover o solvente sob vácuo para proporcionar 14,80 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 256 (M+H)⁺.

Preparação 25

6-Bromo-1-ciclopentil-2-metil-1H-benzoimidazol

[00089] Aquecer uma mistura de 4-bromo-N2-ciclopentil-benzeno-

1,2-diamina (10,6 g), ortoacetato de trietila (9,5 ml) e ácido acético (6,3 mL) a 100 °C por 2,5 h. Diluir com DCM e derramar em uma solução saturada aquosa de bicarbonato de sódio. Secar sobre sulfato de sódio e remover o solvente sob vácuo. Purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel, eluindo com DCM/etanol-10% NH₃ (0-3%) para proporcionar 10,67 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 280 (M+H)⁺.

Preparação 26

N-Isopropil-acetamida

[00090] Adicionar TEA (23,58 mL) a uma solução de 2-propanamina (10 g) em DCM (100 mL) a 0 °C. Em seguida, adicionar cuidadosamente gota a gota ácido acético anidrido (16,15 mL). Agitar à TA durante a noite. Remover o solvente sob vácuo, diluir com etil éter (éter) e filtrar o sólido. Remover o solvente sob vácuo. Diluir o óleo com éter, adicionar carbonato de potássio e agitar durante a noite à TA. Filtrar o sólido e remover o solvente sob vácuo para proporcionar 15,62 g do composto do título. RMN (CDCl₃) 4,06 (m, 1H), 1,94 (s, 3H), 1,14 (d, 6H).

[00091] Preparar as seguintes amidas essencialmente conforme descrito para N-isopropil-acetamida usando a amina correspondente:

Preparação	Composto
27	N-Ciclopropil-acetamida
28	N-Ciclopropilmetil-acetamida
29	N-Ciclopentil-acetamida

Preparação 30

N-(4-Bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina

[00092] Adicionar TEA (10,05 mL) a uma mistura de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina (10,0 g), N-isopropil acetamida (9,73 g), cloreto de fosfonila (6,70 mL) em tolueno (150 mL). Aquecer a mistura a refluxo por 3 h. Resfriar a mistura e remover o solvente sob vácuo. Dissolver o bruto em DCM, lavar com uma solução saturada aquosa de bicarbonato de sódio várias vezes para remover todos os traços de ácido. Secar sobre sulfato de sódio e remover o solvente sob vácuo

para proporcionar 14 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 292 (M+H)⁺.

[00093] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina usando a acetamida correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
31	N-(4-Bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-ciclopropil-acetamidina	290
32	N-(4-Bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-ciclopropilmetil-acetamidina	304
33	N-(4-Bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-ciclopentil-acetamidina	318

Preparação 34

6-Bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

[00094] Adicionar terc-butóxido de potássio (811,43 mg) a uma solução de N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina (2 g) em N-metil formamida (20 mL). Aquecer a mistura a 100 °C por 2 h. Resfriar à TA, adicionar DCM (150 mL), lavar três vezes com cloreto de sódio aquoso saturado (salmoura, 300 mL), secar sobre sulfato de magnésio e remover o solvente sob vácuo. Adicionar hexano e sacudir sobre ultrassom por uns poucos minutos. Filtrar o sólido, repetir a adição de hexano/filtração duas vezes para proporcionar 1,86 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 272 (M+H)⁺.

[00095] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol usando a acetamidina correspondente:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
35	6-Bromo-1-ciclopropil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	270
36	6-Bromo-1-ciclopropilmetil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	284
37	6-Bromo-1-ciclopentil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	298

Preparação 38

4-Fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-

[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol

[00096] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (30,0 g), bis(pinacolato)diboro (42,15 g), triciclo-hexilfosfina (5,43 g), acetato de potássio (32,58 g), e DMSO (200 mL). Adicionar acetato de paládio (2,8 g) e aquecer em banho de óleo preaquecido a 90 °C por 1 h. Diluir com EA (200 mL) e filtrar sobre uma almofada de celite. Lavar a mistura com salmoura (100 mL), secar sobre sulfato de sódio e remover o solvente sob vácuo. Triturar com hexano e filtrar o sólido para proporcionar 27 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 319 (M+H)⁺.

[00097] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol usando os derivados de 6-bromo-benzoimidazol correspondentes:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
39	1-Ciclopropil-4-fluoro-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol	317

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
40	1-Ciclopentil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol	327
41	1-Ciclopropilmetil-4-fluoro-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol	331
42	1-Ciclopentil-4-fluoro-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol	345

Preparação 43

6-(2-Cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

[00098] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de 2,4-dicloro-5-fluoro-pirimidina (12,7 g), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio(II) (4,9 g), carbonato de sódio a 2 M em água (103,7 mL) e 1,2-dimetoxietano (120 mL). Aquecer em um banho de óleo preaquecido a 80 °C e adicionar gota a gota uma solução de 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol (22 g) em 1,2-dimetoxietano (200 mL). Agitar a mistura a 84 °C por 1 h. Resfriar à TA, adicionar EA (800 mL) e lavar duas vezes com salmoura (100 mL). Secar sobre sulfato de magnésio e remover o solvente sob vácuo. Triturar com acetonitrila para proporcionar 14,4 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 323 (M+H)⁺.

[00099] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol usando os derivados de dicloro-pirimidina e boronato correspondentes:

Preparação	Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
44	6-(2-Cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-1-ciclopropil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	321

Preparação	Composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
45	6-(2-Cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-1-ciclopentil-2-metil-1H-benzoimidazol	331
46	6-(2-Cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-1-ciclopropilmetil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	335
47	6-(2-Cloro-pirimidin-4-il)-1-ciclopentil-4-fluoro-2-metil-1H-benzoimidazol	331
48	6-(2-Cloro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol	305

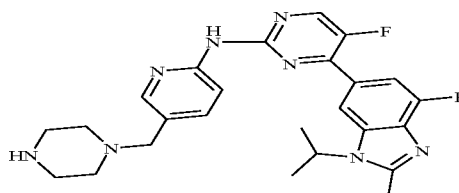
[000100] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina abaixo usando os derivados de amina e cloro-pirimidina correspondentes:

Preparação	Composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
49	terc-butil éster de ácido 4-{6-[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-ilmetil}-piperazina-1-carboxílico	579
50	terc-butil éster de ácido 4-{6-[4-(3-Ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-ilmetil}-piperidina-1-carboxílico	576
51	terc-butil éster de ácido 4-{6-[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-2-metil-piridin-3-ilmetil}-piperidina-1-carboxílico	592
52	terc-butil éster de ácido 6-[4-(3-Ciclopentil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-ilamino]-3',4',5',6'-tetra-hidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico	572

Preparação	Composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
53	terc-butil éster de ácido 6-[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-2-metil-3',4',5',6'-tetra-hidro-2'H-[3,4']bipiridinil-1'-carboxílico	578
54	terc-butil éster de ácido 4-{6-[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-iloxi}-piperidina-1-carboxílico	580
55	terc-butil éster de ácido {6'-[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-2'-metil-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il}-carbâmico	593
56	terc-butil éster de ácido {6'-[4-(3-Ciclopentil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4-il}-carbâmico	587
57	terc-butil éster de ácido 4-{6-[4-(7-Fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-ilsulfanil}-piperidina-1-carboxílico	578

Preparação 58

[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-(5-piperazin-1-ilmetil-piridin-2-il)-amina

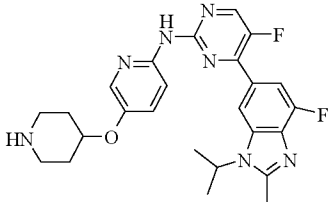
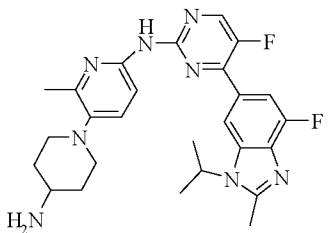
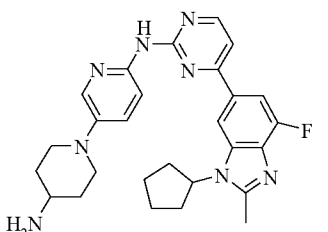
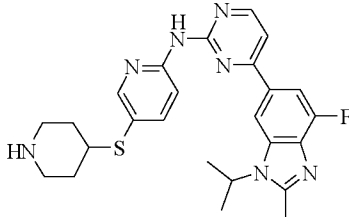


[000101] À uma mistura de terc-butil éster de ácido 4-{6-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-ilamino]-piridin-3-ilmetil}-piperazina-1-carboxílico (150 mg) em DCM (10 mL) e metanol (10 mL) adicionar cloreto de hidrogênio a 4M em dioxano (194 µL). Agitar 10 min e remover o solvente sob vácuo. Purificar por cartucho de troca de cátion forte (SCX) eluindo com metanol e, em

seguida, metanol-NH₃ a 2M, seguido por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM/metanol-NH₃ 2M (3%) para proporcionar 120 mg do composto título. MS (ES⁺): m/z= 479 (M+H)⁺.

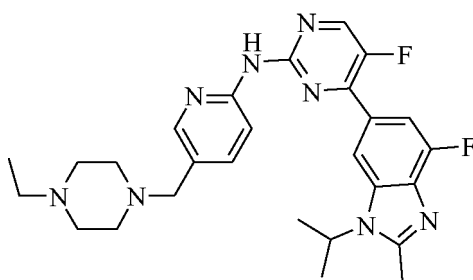
[000102] Preparar os seguintes intermediários essencialmente conforme descrito para [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-(5-piperazin-1-ilmetil-piridin-2-il)-amina:

Preparação	Estrutura	Nome do composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
59		[4-(3-Ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-(5-piperidin-4-ilmetil-piridin-2-il)-amina	476
60		[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-(6-metil-5-piperidin-4-ilmetil-piridin-2-il)-amina	492
61		[4-(3-Ciclopentil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-(1',2',3',4',5',6'-hexa-hidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-amina	472
62		[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-(2-metil-1',2',3',4',5',6'-hexa-hidro-	478

Preparação	Estrutura	Nome do composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
		[3,4']bipiridinil-6-il)-amina	
63		[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(piperidin-4-ilóxi)-piridin-2-il]-amina	480
64		N6'-[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-2'-metil-1,3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	493
65		N6'-[4-(3-Ciclopentil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	487
66		[4-(7-Fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(piperidin-4-ilsulfanil)-piridin-2-il]-amina	478

Exemplo 1

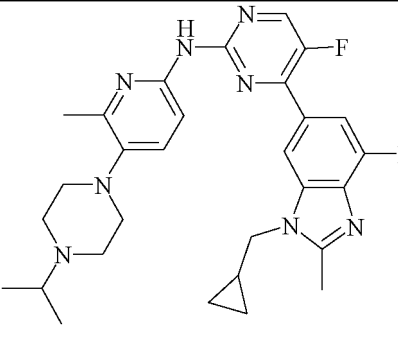
[5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina



[000103] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (15,9 g), 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina (10,85 g), carbonato de cério (32,10 g), tris(dibenzilideneacetona) dipaládio (1,82 g), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (2,35 g) em 1,4-dioxano (197,06 mL). Aquecer a mistura em banho de óleo preaquecido a 110 °C por 2 h. Resfriar à TA, diluir com DCM e filtrar sobre uma almofada de celite. Remover o solvente sob vácuo e purificar por cromatografia de coluna de sílica-gel, eluindo com DCM/metanol (2%) e, em seguida, DCM/metanol-NH₃ 2 M 2% para proporcionar 22,11 g do composto título. MS (ES⁺): m/z= 507 (M+H)⁺.

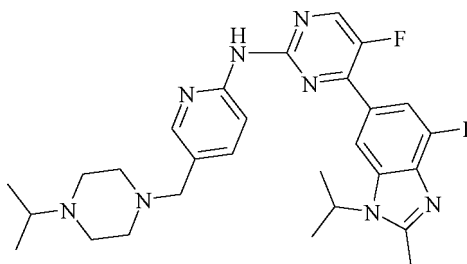
[000104] Preparar os seguintes exemplos essencialmente conforme descrito para [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina usando os derivados de amina e cloro-pirimidina correspondentes:

Exemplo	Estrutura	Nome do Composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
2		[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-il]-amina	521

3		[4-(3-Ciclopropilmetil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-il]-amina	533
---	---	---	-----

Exemplo 4

[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-amina



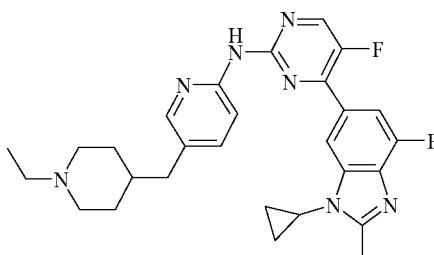
[000105] Adicionar sódio triacetoxiboro-hidreto (299,9 mg) a uma mistura de [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-(5-piperazin-1-ilmetil-piridin-2-il)-amina (130 mg), acetona (31,6 µL), 1, 2-dicloroetano (9 mL) e ácido acético (16,3 µL). Aquecer a 60 °C por 1 h. Remover o solvente sob vácuo. Purificar por cartucho de troca de cátion forte (SCX) eluindo com metanol e, em seguida, metanol-NH₃ a 2 M, seguido por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM/metanol-NH₃ 2 M (3%) para proporcionar 115 mg do composto título. MS (ES⁺): m/z= 521 (M+H)⁺.

[000106] Preparar os seguintes exemplos essencialmente conforme descrito para [5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-amina usando as aminas correspondentes:

Exemplo	Estrutura	Nome do composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
5		[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[6-metil-5-(1-metil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina	506
6		[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidin-4-ilmetil)-6-metil-piridin-2-il]-amina	534
7		[4-(3-Ciclopentil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[1'-isopropil-1',2',3',4',5',6'-hexa-hidro-[3,4']bipiridinil-6-il]-amina	514
8		[5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidin-4-ilóxi)-piridin-2-il]-amina	522

Exemplo 9

[4-(3-Ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[5-(1-etil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina

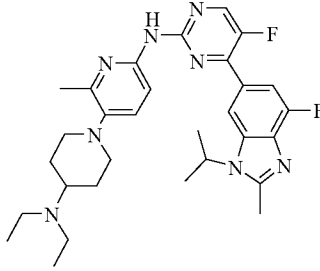
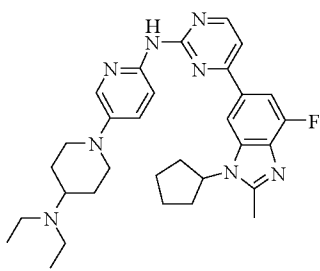
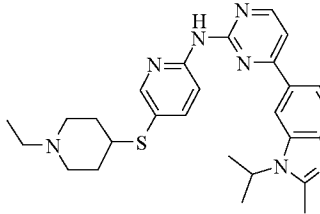


[000107] Adicionar sódio triacetoxiboro-hidreto (720 mg) a uma mistura de [4-(3-ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-

fluoro-pirimidin-2-il]-(5-piperidin-4-ilmetil-piridin-2-il)-amina (110 mg), 1,2 dicloroetano (1,14 mL) e ácido acético (2709 μ L). Aquecer a 60 °C por 1 h. Remover o solvente sob vácuo. Purificar por cartucho de troca de cátion forte (SCX) eluindo com metanol e, em seguida, metanol- NH_3 2M, seguido por cromatografia de coluna de sílica-gel eluindo com DCM/metanol- NH_3 2M (3%) para proporcionar 80 mg do composto título. MS (ES^+): m/z = 504 ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

[000108] Preparar os seguintes exemplos essencialmente conforme descrito para [4-(3-ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[5-(1-etil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina usando as aminas correspondentes:

Exemplo	Estrutura	Nome do composto	MS (ES^+): m/z ($\text{M}+\text{H}$) $^+$
10		[5-(1-Etil-piperidin-4-ilmetil)-6-metil-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	520
11		(1'-Etil-2-metil-1',2',3',4',5',6'-hexa-hidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	506
12		[5-(1-Etil-piperidin-4-ilóxi)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	508

Exemplo	Estrutura	Nome do composto	MS (ES ⁺): m/z (M+H) ⁺
13		N ⁴ ,N ⁴ -Dietil-N ^{6'} -[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-2'-metil-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	549
14		N ^{6'} -[4-(3-Ciclopentil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-N ⁴ ,N ⁴ -dietil-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	543
15		[5-(1-Etil-piperidin-4-ilsulfanil)-piridin-2-il]-[4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	506

Exemplo 16

Metanossulfonato de [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

[000109] Adicionar ácido metanossulfônico (63,59 mL) a uma solução de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina (17,3 g) em uma mistura de DCM (100 mL) e metanol (100 mL). Agitar a solução por 1 h e remover o solvente sob vácuo. Triturar com MtBE e filtrar o sólido para proporcionar 20,4 g do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 507 (M+H)⁺.

[000110] Preparar os seguintes exemplos essencialmente conforme descrito para metanosulfonato de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-

pirimidin-2-il]-amina:

Exemplo	Composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
17	Metanossulfonato de [5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-il]-amina	521
18	Metanossulfonato de [4-(3-Ciclopropilmetil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-il)-6-metil-piridin-2-il]-amina	533
19	Metanossulfonato de [5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(4-isopropil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-amina	521
20	Metanossulfonato de [5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[6-metil-5-(1-metil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina	506
21	Metanossulfonato de [5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidin-4-ilmetil)-6-metil-piridin-2-il]-amina	534
22	Metanossulfonato de [4-(3-Ciclopentil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-(1'-isopropil-1',2',3',4',5',6'-hexa-hidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-amina	514
23	Metanossulfonato de [5-Fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-[5-(1-isopropil-piperidin-4-ilóxi)-piridin-2-il]-amina o	522
24	Metanossulfonato de [4-(3-Ciclopropil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-5-fluoro-pirimidin-2-il]-[5-(1-etil-piperidin-4-ilmetil)-piridin-2-il]-amina	504

Exemplo	Composto	MS (ES+): m/z (M+H)+
25	Metanossulfonato de [5-(1-Etil-piperidin-4-ilmetil)-6-metil-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	520
26	Metanossulfonato de (1'-Etil-2-metil-1',2',3',4',5',6'-hexa-hidro-[3,4']bipiridinil-6-il)-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	506
27	Metanossulfonato de [5-(1-Etil-piperidin-4-ilóxi)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	508
28	Metanossulfonato de N4,N4-Dietil-N6'-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-2'-metil-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	549
29	Metanossulfonato de N6'-[4-(3-Ciclopentil-7-fluoro-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-N4,N4-dietil-3,4,5,6-tetra-hidro-2H-[1,3']bipiridinil-4,6'-diamina	543
30	Metanossulfonato de [5-(1-Etil-piperidin-4-ilsulfanil)-piridin-2-il]-[4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina	506

Exemplo 31

[5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

Forma cristalina I

[000111] Misturar 102,1 mg de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina amorfa com 2 mL de acetona. Isolar o sólido precipitado por filtração a vácuo, produzindo uma torta amarelo-clara e secar no local no aparelho de filtração por 30 min, dando 72,1 mg de um sólido. Colocar o sólido em um forno avácuo a 100°C por 3 h.

[000112] Os picos representativos XRD da forma I são mostrados na tabela 1.

Exemplo 32

[5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

Forma cristalina III

[000113] Misturar 208 mg de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina amorfa com 4 mL de acetona. Fluidizar a suspensão por 2 h a 60°C enquanto agita-se a 1000 rpm, e, em seguida, isola-se o sólido por filtração à vácuo, produzindo uma torta amarelo-clara. Secar no local no aparelho de filtração por 30 min, dando 112 mg de um sólido (54% de rendimento). Colocar em um forno a vácuo a 80°C por 3 h.

[000114] Os picos representativos XRD da forma III são mostrados na tabela 2. As posições de pico foram verificadas usando-se um padrão externo.

Difração de Pó de Raios X

[000115] Os padrões de XRD dos cristais são obtidos em um difratômetro de pó de raios X Bruker D8 Advance, equipado com uma fonte CuK α (λ = 1,54056 Å) e um detector Vantec, operando a 50 kV e 40 mA. Cada amostra é escaneada entre 4 e 40° em 2 θ , com um tamanho de etapa de 0,02° em 2 θ e uma taxa de escaneamento de 9,0 segundos/etapa, e com 1 mm de divergência e recebendo fendas e uma fenda de detector de 0,1 mm. O pó seco é acondicionado em retentor de amostra de carregamento de topo recessado e uma superfície lisa é obtida usando-se uma lâmina de vidro. Os padrões de difração de forma de cristal são coletados à temperatura ambiente e umidade relativa. O antecedente para o cristal de forma III é removido ante da captação do pó que o antecedente não é removido da forma

I.

[000116] É bem conhecido na técnica de cristalografia que, para qualquer dada forma de cristal, as intensidades relativas dos picos de difração podem variar devido à orientação preferida resultante de fatores tais como morfologia de cristal e aspecto. Onde os efeitos da orientação preferida estão presentes, intensidades de pico são alteradas, mas as posições de pico características do polimorfo são inalteradas. Vide, por exemplo, A Farmacopeia dos Estados Unidos #23, National Formulary #18, páginas 1843-1844, 1995. Além disso, é também bem conhecido na técnica de cristalografia que para qualquer dada forma de cristal as posições de pico angular podem variar levemente. Por exemplo, posições de pico podem se alterar devido a uma variação na temperatura ou umidade na qual uma amostra é analisada, deslocamento da amostra, ou a presença ou ausência de um padrão interno. No presente caso, uma variabilidade de posição de pico de $\pm 0,1$ em 2θ levará em conta estas variações potenciais sem impedir a identificação inequívoca da forma de cristal indicada.

[000117] A confirmação de uma forma de cristal pode ser feita à base de qualquer combinação única de distinção de picos (em unidades de $^{\circ} 2\theta$), tipicamente os picos mais proeminentes. Desse modo, uma amostra preparada de forma cristalina I de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina é caracterizada por um padrão XRD usando radiação $\text{CuK}\alpha$ como tendo picos de difração (valores 2-teta) conforme descrito na tabela 1 abaixo, e, em particular, tendo picos a 4,51 em combinação com um ou mais dos picos selecionados a partir do grupo consistindo em 13,09, 16,31 e 18,82; com uma tolerância para os ângulos de difração de 0,1 grau.

Tabela 1: Picos de difração de pó de raios X de forma cristalina I de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-

fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina.

Ângulo ° 2θ	Valor d Angstrom	% Intensidade
4,51	19,60	100
5,89	15,00	4
8,98	9,84	1,5
11,20	7,89	2,3
12,57	7,04	1,9
13,09	6,76	7
15,93	5,56	3
16,31	5,43	4,4
17,01	5,21	1,9
18,58	4,77	3,1
18,82	4,71	3,6
20,86	4,26	1,5
21,90	4,06	2,2
23,12	3,84	2,4
23,53	3,78	3,7
26,71	3,33	2,4
26,85	3,32	2

[000118] Uma amostra preparada de forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina é caracterizada por um padrão XRD usando radiação CuKα como tendo picos de difração (valores 2-teta) conforme descrito na tabela 2 abaixo, e em particular tendo picos a 21,29 em combinação com um ou mais dos picos a 11,54, 10,91, e 12,13; com uma tolerância para os ângulos de difração de 0,1 grau.

Tabela 2: Picos de difração de pó de raios X de forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina.

Ângulo ° 2θ	Valor d Angstrom	% Intensidade
7,44	11,87	8
10,91	8,11	19
11,54	7,66	38
12,13	7,29	18
13,89	6,37	25
14,91	5,94	20

Ângulo ° 2θ	Valor d Angstrom	% Intensidade
15,63	5,67	27
16,06	5,52	11
18,59	4,77	21
18,94	4,68	26
20,43	4,34	21
21,29	4,17	100
21,91	4,05	37
22,13	4,01	12
22,45	3,96	8
23,12	3,84	6
23,42	3,80	9
25,95	3,43	17
29,42	3,03	9

Estado-Sólido ^{13}C RMN

[000119] Polarização cruzada/rotação de espectro de ângulo mágico (CP/MAS) RMN (estado-sólido RMN ou SSNMR) é obtida em um espectrômetro de RMN de furo amplo Bruker Avance III 400 operando a frequências de ^1H e ^{13}C de 400,131 e 100,623 MHz, respectivamente, e usando-se uma sonda de ressonância dupla de 4 mm Bruker. A taxa de MAS é ajustada para 5 ou 10 kHz usando-se um controlador Bruker MAS-II; velocidades de rotação são mantidas dentro de 2 Hz do ponto ajustado. O desacoplamento SPINAL64 a uma frequência de mutação de próton de 100 kHz é usado para desacoplamento heteronuclear. As faixas laterais de rotação são eliminadas por uma sequência de faixa lateral total de cinco pulsos (TOSS). O tempo de contato de CP para transferência de magnetização de prótons para carbonos é ajustada para 4 ms e uma rampa de energia linear de 93,5 a 46,9 kHz é usada no canal ^1H para intensificar a eficiência de CP. O tempo de aquisição é ajustado para 34 ms e espectros são adquiridos sobre uma largura espectral de 30 kHz com um retardo de reciclo de 5 s. A temperatura da amostra é regulada a 297 ± 1 K de modo a minimizar aquecimento friccional causado por rotação de amostra. As alterações químicas ^{13}C são externamente referenciadas ($\pm 0,05$ ppm) ao pico ^{13}C desacoplado de

próton de tetrametilsilano (líquido) via a ressonância de alto campo de adamantina ($\delta = 29,5$ ppm).

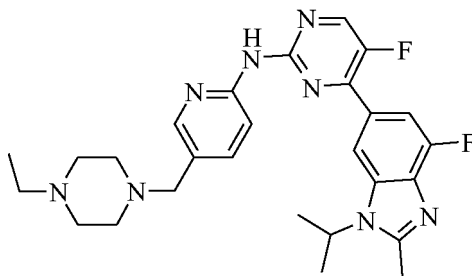
[000120] Uma lista de pico de alterações químicas para forma cristalina III de [5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina é conforme segue:

^{13}C -RMN: $\nu(\text{F1})$ (ppm) 11,7, 12,9, 20,5, 48,6, 52,5, 59,4, 108,9, 110,0, 112,7, 127,3, 129,4, 135,5, 136,4, 148,8, 150,1, 152,2, 154,5, 156,3.

Exemplo 33

[5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina

[000121] Forma cristalina III – Rota B



a. 1-(6-Bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina

[000122] Adicionar 1-etilpiperazina líquida (5,6 kg) a uma mistura de 6-bromo-piridina-3-carbaldeído (8,3 kg) e DCM (186 kg). Em seguida, adicionar sódio triacetoxiboro-hidreto (10,9 kg) em porções e agitar a 20-30°C por 12 h. Resfriar rapidamente a reação em uma mistura de DCM (36 kg) e solução aquosa de hidróxido de sódio 2 N (46 kg). Separar as camadas e extrair duas vezes a camada aquosa com DCM (24 X 2 kg). Combinar as camadas orgânicas, lavar com salmoura (50 X 2 kg) e remover o solvente sob vácuo para proporcionar 11,5 kg do composto título. MS (ES^+): $m/z = 285$ ($\text{M}+\text{H}^+$).

b. 5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina

[000123] Adicionar amônia líquida (50,0 kg) a uma mistura

desgaseificada de 1-(6-bromo-piridin-3-ilmetil)-4-etil-piperazina (14.2 kg), óxido cuproso (200 g), e MeOH (57 kg) a $T \leq 40^{\circ}\text{C}$. Aquecer a mistura a $65-75^{\circ}\text{C}$ durante a noite. Resfriar a $20-30^{\circ}\text{C}$ e filtrar sobre uma almofada de Celite®. Concentrar o filtrado e adicionar DCM (113 kg) e ajustar o pH a 12-14 com hidróxido de sódio 2N (23 kg), separar as fases e lavar a fase orgânica com DCM (58 X 2 kg) e combinar as camadas orgânicas. Filtrar a mistura através de Celite® e concentrar. Dissolver o resíduo em tolueno (9,7 kg) e cristalizar pela adição de MtBE (8,3 kg) para dar 6,0 kg do composto título. Obter adicionalmente purificação através de uma recristalização de tolueno. MS (ES^+): $m/z = 221$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

c. N-Isopropil-acetamida

[000124] Adicionar carbonato de potássio (28 kg) a uma solução de 2-propanamina (12 kg) em acetato de etila (108 kg) a $<20^{\circ}\text{C}$. Resfriar a mistura a $5-0^{\circ}\text{C}$ e adicionar cloreto de acetila (16,7 kg) a cerca de 2-3 kg/h. Agitar até completação por cromatografia de gás. Resfriar rapidamente a reação com água (0,8 kg) e filtrar a mistura de reação e concentrar para proporcionar 13,4 kg do composto do título. RMN (CDCl_3) 4,06 (m, 1H), 1,94 (s, 3H), 1,14 (d, 6H).

d. N-(4-Bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina

[000125] Adicionar cloreto de fosforila (16,0 kg) a uma mistura de 4-bromo-2,6-difluoro-fenilamina (14,5 kg), N-isopropil acetamida (8,5 kg), TEA (10,6 kg) em tolueno (115 kg) a $<20^{\circ}\text{C}$. Agitar a $10-20^{\circ}\text{C}$ até completação por HPLC. Remover o solvente sob vácuo e adicionar MtBE (64 kg). Ajustar o pH da mistura com carbonato de sódio aquoso 10% (250 kg). Filtrar a mistura e enxaguar a massa com MtBE (11 X 2 kg). Separar as fases e lavar a camada aquosa com MtBE (22 X 2 kg). Combinar as camadas orgânicas e concentrar, filtrar e lavar com ciclohexano (0,6 kg) e secar para proporcionar 17,2 kg do composto do título. MS (ES^+): $m/z = 292$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

e. 6-Bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

[000126] Adicionar terc-butóxido de potássio (6,9 kg) em porções a uma solução de N-(4-bromo-2,6-difluoro-fenil)-N'-isopropil-acetamidina (16,2 kg) em N-metil formamida (76 kg), enquanto mantém-se a temperatura a $T < 30^{\circ}\text{C}$. Aquecer a mistura a $70-75^{\circ}\text{C}$ até completação por HPLC. Resfriar a $20-30^{\circ}\text{C}$ e resfriar rapidamente por adição em água (227 kg) em seguida extrair com MtBE (37 X 4 kg). Lavar as fases orgânicas combinadas com salmoura (49 X 2 kg) e concentrar a 25-30L, adicionar n-hexano (64 kg) e filtrar a pasta fluida para dar 11 kg do composto título. MS (ES^+): $m/z = 272$ ($\text{M}+\text{H}$)⁺.

[000127] Obter purificação adicional por dissolução do composto bruto em DCM e filtrar através de uma almofada de sílica-gel e Celite®, seguido por isolamento de uma mistura de MtBE/hexano.

f. 4-Fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-

[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol

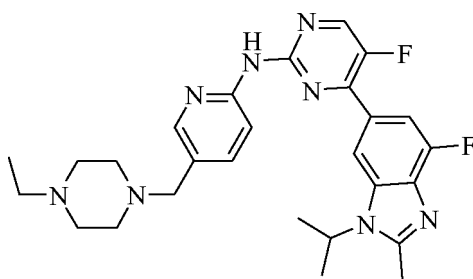
[000128] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de 6-bromo-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (600 g), bis(pinacolato)diboro (843 g), triciclo-hexilfosfina (106 g), acetato de potássio (652 g), e DMSO (3,6 L). Adicionar acetato de paládio (49 g) e aquecer a 100°C até completação por HPLC. Resfriar a mistura de reação e diluir com água (18 L), em seguida filtrar para isolar o sólido. Dissolver o material bruto em 1,2-dimetoxietano (450 mL) e filtrar através de Celite®. Usar o filtrado diretamente na parte g.

g. 6-(2-Cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol

[000129] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de 2,4-dicloro-5-fluoro-pirimidina (517 g), carbonato de sódio (586 g) em água (1,7 L) e 1,2-dimetoxietano (3,4 L). Adicionar bis(trifenilfosfina)cloreto de paládio(II) (4,9 g) e aquecer a reação a $80 \pm 3^{\circ}\text{C}$ e adicionar gota a gota uma solução de 4-fluoro-1-isopropil-2-metil-6-(4,4,5,5-tetrametil-

[1,3,2]dioxaborolan-2-il)-1H-benzoimidazol em 1,2-dimetoxietano da parte f (5,1 L). Agitar a mistura a $80\pm 3^{\circ}\text{C}$ até completação por HPLC. Resfriar à TA e diluir com água fria (2,1 L, 5°C). Agitar por 1 hora, em seguida, isolar o sólido bruto por filtração. Alcançar adicionalmente purificação do sólido por trituração com IPA para dar 472 g do composto do título. MS (ES^+): $m/z = 323$ ($\text{M}+\text{H}$) $^+$.

h. Forma cristalina III de [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina



[000130] Borbulhar nitrogênio em uma mistura de 6-(2-cloro-5-fluoro-pirimidin-4-il)-4-fluoro-1-isopropil-2-metil-1H-benzoimidazol (465 g), 5-(4-etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-ilamina (321 g), carbonato de potássio (403 g), 4,5-bis(difenilfosfino)-9,9-dimetilxanteno (17 g) em álcool t-amílico (2,3 L). Aquecer dipaládio de tris(dibenzilidenoacetona) (13,2 g) e a mistura a $100\pm 5^{\circ}\text{C}$ até completação por HPLC. Resfriar à TA, diluir com DCM (1,2 L) e filtrar sobre uma almofada de Celite®. Extrair o filtrado com 4M de HCl (2,3 L X 2). Combinar as camadas aquosas e agitar com carvão (32 g). Filtrar através de Celite®, adicionar DCM (1,7 L) e ajustar o pH com NaOH (28% aq., 1,5 L). Coletar a camada orgânica e lavar a camada aquosa com DCM (1,7 L). Combinar as camadas orgânicas, lavar com salmoura (1 L), e secar sobre sulfato de magnésio. Usar um sólido suportado de tratamento de Si-Tiol para remover paládio residual e o solvente é trocado por acetona. Filtrar a pasta fluida e secar para dar 605 g de produto bruto como forma I. Misturar 605 g de forma I e 4,3 L de acetona seca.

Fluidificar a suspensão a 56-57°C (refluxo) por pelo menos 18 horas e, em seguida, à temperatura ambiente por 4 horas. Isolar o sólido por filtração a vácuo, produzindo uma torta amarelo-clara. Secar o sólido em um forno à vácuo a 35°C até que um peso constante de 570 g seja obtido. Confirmar o material por XRPD para ser a forma III do composto do título. MS (ES⁺): m/z= 507 (M+H)⁺.

[000131] Os resultados dos seguintes ensaios demonstram evidência que os compostos aqui exemplificado são úteis como inibidores específicos de CDK4/6 e como agentes anticâncer. Conforme aqui usado, "IC₅₀" se refere à concentração de um agente que produz 50% da resposta inibitória máxima possível para que o agente e "EC₅₀" se referiram a concentração de um agente que produz 50% da resposta máxima possível para este agente.

Ensaio de Inibição de CDK4

[000132] Para demonstrar que os compostos incluídos dentro da presente invenção exibem afinidade para CDK4 quinase, um ensaio de CDK4 é realizado. Os ensaios funcionais proporcionam suporte que os compostos da presente invenção exibem a capacidade de inibir a atividade de CDK4 quinase. Todos os ligantes, radioetiquetas, solventes, e reagentes empregados nos seguintes ensaios são prontamente disponíveis de fontes comerciais, ou podem ser prontamente sintetizados por um versado na técnica.

[000133] 10 µL de composto de teste em 20% de DMSO, 20 µL de adenosina 5'-trifosfato (ATP) e solução de Fragmento C-Terminal de Retinoblastoma (CTRF) (Upstate cat# 12-439), e 10 µL de solução de enzima são misturados em uma placa de 96 poços. A solução de ATP e CRTF é preparada de uma mistura de 40 µM de ATP, 0,16 µCi [³³P] –ATP e 1µM de CTRF diluído em tampão de quinase de 68 mM de ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico (HEPES) pH 7,4, 6,72 mM de MgCl₂, 6,72 mM de ditioneitol (DTT), e 0,013% de

TRITON® X-100. A solução de enzima é preparada de 8 ng de enzima de CDK4 (Proquinase cat# 0142-0373-1) diluída no tampão de quinase descrito acima. Os compostos de testes são diluídos em série 1:3 em 20% de DMSO para criar uma curva de ponto 10 a uma concentração de partida de 20 μ M. 20% de tampão de DMSO sozinho sem adicionar composto teste é empregado como um controle, 500 mM de etileno diamina ácido tetra-acético (EDTA) é usado para determinar o nível de antecedente ^{33}P na ausência de atividade de enzima. Os reagentes são misturados e incubados por 90 min a 20°C. A reação é terminada pela adição de 80 μ L 10% (v/v) de H_3PO_4 e precipitação de material em placas de filtragem de fibra de vidro (Millipore, MAFC N0B 50). Os poços são lavados quatro vezes com 0,5% de H_3PO_4 e a radioatividade incorporada é determinada com um contador de cintilação de microplaca (Microbeta Trilux, Wallac).

[000134] A diferença entre o valor médio de controle alto e baixo é tomada como 100% de atividade. Uma ajuste de curva de logística de quatro parâmetros é usada para gerar os valores IC_{50} usando software ActivityBase® (IDBS, Alameda CA). Todos os sais de mesilato dos compostos exemplificados revelam um IC_{50} de < 10 nM no ensaio acima. O composto do exemplo 25 tem um IC_{50} de 3 nM no ensaio acima. Isto demonstra que os sais de mesilato dos compostos exemplificados são inibidores potentes de CDK4.

Ensaio de Inibição de CDK6

[000135] 10 μ L de composto de teste em 20% de DMSO, 20 μ L de solução de ATP e CTRF (Upstate cat# 12-439), e 10 μ L de solução de enzima são misturados em uma placa de 96 poços. A solução de ATP e CTRF é preparada para dar uma concentração final de 100 μ M de ATP, 0,5 μ Ci [^{33}P] –ATP e 0,8 μ M de CTRF diluído em tampão de quinase de 68 mM de HEPES pH 7,4, 6,72 mM de MgCl_2 , 2,64 mM de DTT, e 0,004% de TRITON® X-100. A solução de enzima é preparada

pra uma concentração final de 1,7 ng/ μ L de enzima de CDK6 (Proquinase cat# 7533) diluída no tampão de quinase descrito acima no ensaio de inibição de CDK4. Os compostos de teste são diluídos em série 1:3 em 20% de DMSO para criar um ponto de curva 10 a uma concentração de partida de 20 μ M. 20% de tampão de DMSO sozinho sem composto de teste adicionado é empregado como um controle, 500 mM de EDTA é usado para determinar o nível de antecedente ^{33}P na ausência de atividade de enzima. Os reagentes são misturados e incubados por 90 min a 20 °C. A reação é terminada pela adição de 80 μ L 10% (v/v) de H_3PO_4 e precipitação de material em placas de filtragem de fibra de vidro (Millipore, MAFC N0B 50). Os poços são lavados quatro vezes com 0,5% de H_3PO_4 e a radioatividade incorporada é determinada com um contador de cintilação de microplaca (Microbeta Trilux, Wallac).

[000136] O dado é analisado na mesma maneira como para CDK4. Os compostos exemplificados preferidos exibem um IC_{50} de < 30 nM no ensaio acima. O composto do exemplo 19 tem um IC_{50} de 5 nM no ensaio acima. Isto demonstra que os compostos exemplificados preferidos são inibidores potentes de CDK6.

Ensaio para Inibição de PIM1 Quinase

[000137] Pim-1 (humano, 0,46 nM de concentração final) é incubado com 8 mM de MOPS pH 7,0, 0,2 mM de EDTA, 100 μ M de um peptídeo de substrato apropriado (vide protocolo de ensaio de inibição de Pim-1 quinase conforme descrito em Chen, L.S. *et al.* (2009) *Blood*, DOI: 10.1182/blood-2009-03-212852), 10 mM de MgAcetato e [γ - ^{33}P -ATP] (atividade específica de aproximadamente 500 cpm/pmol, concentração conforme requerida). A reação é iniciada pela adição da mistura de MgATP e, em seguida, incubada por 40 minutos a temperatura ambiente. A reação é cessada pela adição de 3% de solução de ácido fosfórico. 10 μ L da reação é, em seguida, colocada

em pontos em um P30 filtermat e lavada três vezes por 5 minutos em 75 mM de ácido fosfórico e uma vez em metanol antes de secagem e contagem de cintilação. Para teste de inibição de composto, os compostos providos como 10 mM de estoques em 100% de DMSO são diluídos 1:10 em 100% de DMSO para dar um estoque 50x da concentração superior da curva. O estoque 50x é, em seguida, diluído em série 1:3 em 100% de DMSO para criar uma curva de resposta de concentração de ponto 10 e diluído 1:50 (20 μ M a 0,001 μ M final em 2% de concentração de DMSO final) na mistura de reação para determinar atividade do composto. Os poços de controle contêm DMSO somente enquanto a linha de base é estabelecida nas cavidades de controle cessadas de ácido no tempo 0 minutos. A percentagem de inibição determinada dos controles em cada placa e dados de concentração de composto de ponto dez foram, em seguida, ajustados a uma equação de logística de quatro parâmetros usando ACTIVITYBASE 4.0.

[000138] Os compostos exemplificados preferidos revelam um IC_{50} de < 0,01 μ M. O composto do exemplo 25 tem um IC_{50} de 0,003 μ M no ensaio descrito acima. Isto demonstra que os compostos exemplificados preferidos são inibidores potentes de Pim-1 quinase.

Ensaio de Solubilidade

[000139] As quantidades apropriadas de composto de teste são pesadas em frascos cromatográficos separados. O volume requerido de tampão de fosfonato a 0,05M, pH 8,0 (dissolver 6,7 g de Fosfato de Sódio Dibásico X 7H₂O em 500 mL de água de grau de HPLC, ajustar a pH 8,0 com Ácido Fosfórico 85%) é adicionado ao frasco de amostra para alcançar concentração-alvo de 2,0 mg/mL. Uma solução-padrão apropriada em DMSO é preparada pela adição do volume requerido de DMSO ao frasco-padrão para alcançar uma concentração-alvo de 2,0 mg/mL. Os frascos são cobertos seguramente e colocados em um

dispositivo de rotação. Os frascos são girados através de 360° por pelo menos 16 horas à temperatura ambiente com uma velocidade angular de cerca de 50 rpm. Um exame visual dos frascos individuais é realizado após rotação. 250 µL de cada frasco é filtrado através de um filtro de vidro de 0,7 µm. O filtrado de amostra e filtrado-padrão são coletados em poços separados de placas de 96 poços profundos. Uma série de diluição é preparada (2000 µg/mL, 200 µg/mL, 20 µg/mL 2,0 µg/mL mais um intervalo de amostra de DMSO) por diluição em série apropriada em DMSO dos 2,0 mg/mL de solução-padrão.

[000140] As soluções de amostra-padrão são analisadas por HPLC (Coluna LC: XTerra MS, C18, 2,1 X 50 mm, 3,5 µm, a 50°C; fases móveis: A – 0,2% de Ácido Fórmico em Água; B – 0,2% de Ácido Fórmico em acetonitrila; Gradiente: 5-100% de B em 3 min, reter a 100% de B por 0,5 min; taxa de fluxo: 750 µL/min; volume de injeção: 1 µL; escaneamento de detector de série de Diodo de 200 nm a 400 nm. O comprimento de onda extraído e usado para quantificação é selecionado para proporcionar a estimativa mais precisa das preparações de amostra). O tempo de retenção usado para a transferência de pico para o composto de teste é obtido a partir de 200 µg/mL de cromatograma de preparação-padrão.

[000141] Os valores de solubilidade são calculados usando uma curva de calibração de nível quatro. A linha de melhor ajuste para área de pico de padrões de calibração calculados por sistema de dados de controle cromatográfico usando ajuste linear ou quadrático a zero é usada. Os resultados da solubilidade são reportados em mg/mL. Os compostos exemplificados preferidos revelam uma solubilidade de pelo menos 2 mg/mL em tampão de fosfato de pH 8 usando o ensaio acima. O composto do exemplo 16 revela uma solubilidade de 2,099 mg/mL em tampão de fosfato de pH 8 usando o ensaio acima. Este dado desse modo demonstra que os compostos exemplificados

preferidos da invenção são prontamente solúveis em uma solução aquosa.

Ensaio de Biodisponibilidade Oral de Rato

[000142] Ratos machos Sprague Dawley (faixa de peso corpóreo 250-320 g) com cânulas arteriais femorais de habitação são obtidas de Charles River, Wilmington, MA 01887, USA. O composto de teste é administrado intravenosamente em solução (2 mL/kg) em: 10% de N-metil pirolidona/18% de Captisol® em 22,5 mM de tampão de fosfato, pH 3. A concentração de droga final é 0,25 mg/mL (equivalentes de base livre). Amostras de sangue são obtidas usando a cânula de habitação por 24 horas. Aos animais são, em seguida, administrados uma dose oral de composto de teste em suspensão (5 mL/kg) em 1% p/v de hidroxietilcelulose/0,25% v/v de polisorbato, 80/0,05% v/v de antiespuma em água purificada. A concentração de droga final é 0,2 mg/mL (equivalentes de base livre). Amostras de sangue adicionais são coletadas via a cânula de habitação por 24 horas. AS amostras de plasma foram obtidas por centrifugação e armazenadas congeladas (-20°C) antes da análise.

[000143] Um composto-padrão interno (para normalização) em acetonitrila/metanol (1:1, v/v) é adicionado às amostras de plasma para precipitar proteína e as amostras são centrifugadas antes da análise. Os sobrenadantes são analisados por injeção e eluição de gradiente rápido em uma coluna Betasil C18 (cartucho de 20 x 2,1 mm, Fase Móvel A: Água/1 M de bicarbonato de amônia, 2000:10 v/v, Fase Móvel B: MeOH/ 1 M de bicarbonato de amônia, 2000:10 v/v). Os analitos eluídos são detectados por análise de LC-MS-MS usando um espectrômetro de massa quadripolar triplo Sciex API 4000. As concentrações de compostos em plasma são determinadas de preparações-padrão sob condições idênticas.

[000144] A biodisponibilidade oral é obtida por divisão da área sob a

curva de tempo de concentração de plasma após administração oral pela área sob a curva em seguida a administração intravenosa (após normalização de dose administrada). Os resultados são apresentados como biodisponibilidade de fração relativa a dose intravenosa (%F). Os compostos exemplificados preferidos revelam um valor%F de >20% no ensaio acima mencionado. O composto do exemplo 22 revela um valor%F de 48,5% no ensaio acima mencionado. Isto demonstra que os compostos exemplificados preferidos têm boa disponibilidade oral.

Inibição de Fosforilação de Proteína de Retinoblastoma (pRb) e Ensaio de Conteúdo de DNA

[000145] Células COLO 205 de American Type Culture Collection (ATCC) são colocadas em 2000 células/poço em placas de 96 poços Beckman Dickinson BIOCOAT®, e são incubadas em meio RPMI 1640 (por exemplo GIBCO, catalog # 52400-025) com 10% de Soro Bovino Fetal (FBS, por exemplo, Gibco cat #11000-144) e 1% de piruvato de sódio (Gibco catalog #11360-070) em 37°C, 5% de CO₂ por 24 h. As células são tratadas pela adição de composto de teste ao meio, dosando-se em 10 pontos de diluições 1:3 através da faixa de 20 µM a 0,001 µM, e com concentração de DMSO final a 0,25%. Após 24 horas de exposição aos compostos, as células são fixadas com o fixador PREFER® [Anatech LTD., Cat # 414] por 30 min a TA, em seguida são permeabilizadas com 0,1% de TRITON® X100 em solução de salina tamponada em fosfato (PBS) por 15 min a TA. As células são lavadas duas vezes com PBS, em seguida digeridas com 50 µg/mL de RNase (Ribonuclease A, Sigma cat# R-6513) em incubadoras a 37°C por 60 min. As células fixadas são bloqueadas com 1% de albumina de soro bovino (BSA, Amersham cat # RPN412V) por 30 min. Anticorpo primário, anticorpo monoclonal de camundongo anti-fosfoRB purificado (BD Pharmigen cat # 558385), é adicionado a 1:2000 em

PBS com 1% de BSA às células e incubado durante a noite a 4 °C. Após 3 lavagens de PBS, as células são incubadas com anticorpo secundário etiquetado Alexa488, cabra anticamundongo IgG Alexa 488 (Invitrogen cat # A11017) por 1 hora a TA. Novamente elas são lavadas três vezes com PBS, e, em seguida, 15 µM de iodeto de propidium (diluição 1:100 com PBS a partir da solução original, Invitrogen cat # P3566) é adicionado para manchar o núcleo. Placas de fluorescência são escaneadas com ACUMEN EXPLORER® [citômetro de microplaca de fluorescência de escaneamento a laser (compreendendo de 488 nm de excitação de laser de íon de argônio e detecção de tubo fotomultiplicador múltiplo), fabricado por LABTECH LTD] para medir fosforilação de proteína Rb e teor de DNA. A análise de imagem é à base dos sinais fluorescentes celulares para identificação de células em subpopulações diferentes. As saídas do ensaio são percentagem de cada subpopulações identificadas, %fosfoRB positivo, % 2 N e % 4 N. Os valores IC₅₀ e EC₅₀ são determinados pelo ajuste de curva a uma logística de quatro parâmetros para cada saída usando ACTIVITY BASE®. Todos os sais de mesilato dos compostos exemplificados revelam um IC₅₀ de < 200 nM no ensaio acima. O composto do exemplo 25 tem atividade de cerca de 100 nM no ensaio acima. Isto demonstra que os sais de mesilato dos compostos exemplificados são inibidores potentes de atividade de CDK4/6 quinase (conforme medida por um baixo nível de fosforilação de pRb) em um ensaio à base de célula total *in vitro*.

[000146] Adicionalmente, todos os sais de mesilato dos compostos exemplificados são capazes de induzir captura específica na fase G1 do ciclo de célula mesmo quando presentes em concentrações de pelo menos 2 µM. Captura de G1 específica é indicada por >90% de células tendo um genótipo 2N. A captura específica de G1 mesmo em concentrações fisiologicamente relevantes de composto ativo

demonstra que os compostos da invenção são inibidores específicos de CDK4/6 e que inibição não específica de outras Cdk's é minimizada, que resultaria em captura de ciclo de célula em outras fases.

Modelos de Xenoenxerto Subcutâneo Humano

[000147] Células de câncer colorretal humanas (colo-205), células de leucemia mieloide aguda humana (AML) (MV4-11), células de glioblastoma humano (U87MG), e células de câncer de pulmão humano (NCI H460 e calu 6) são expandidas na cultura (colo-205 e NCI H460 são crescidos em meio RPMI 1640 com L-glutamina, 25 mM de HEPES, 1 mM de Na piruvato, 10% de FBS; MV4-11 é crescido em meio Iscove's modificado Dulbecco com L-glutamina, 25 mM de HEPES, 10% de FBS; U87MG e calu 6 são crescidos em Eagle's MEM com Sais Earle, L-glutamina e amino ácidos não essenciais, 1 mM de Na piruvato e 10% de FBS coletado (colo-205, U87-MG, calu 6 e NCI-H460 tripsinizado (Invitrogen catalog 25200-056); MV4-11 por centrifugação), e injetado subcutaneamente (5 milhões de células/animal misturados 1:1 em Matrigel, BD Biosciences) no flanco traseiro de camundongos desnudos atímicos. O composto de teste é preparado em um veículo apropriado (1% de hidroxietil celulose, em 25 mM de tampão de fosfato pH 2), e é administrado por bebida oral diária (a 25, 50 ou 100 mg/kg (mpk)) por 21 dias quando tumores são estabelecidos (11-29 dias após implante). A resposta do tumor é determinada por medição do volume de tumor realizada duas vezes uma semana durante o curso de tratamento.

[000148] O método estatístico para avaliação do Retardo de Crescimento de Tumor (TGD- Método de interpolação individual) é conforme segue: para cada animal, o tempo para alcançar um volume específico de tumor (limite) é calculado por interpolação entre a última medição antes de alcançar o limite e a próxima medição. A interpolação é linear usando $\log_{10}$ (volume) vs. tempo. Se um animal

nunca alcança o limite, seu tempo de cruzamento é reportado em ">T" onde T é o último dia medido para aquele animal. Estes tempos de cruzamento são analisados como dados de "tempo para evento" com censura correta usando uma distribuição de Weibull. Desvios médio e padrão são determinados para cada grupo de tratamento. O retardo de crescimento de tumor (TGD) é a diferença em tempo de cruzamento médio entre um grupo tratado e o grupo de controle de veículo. Testes-T são realizados usando os desvios médio e padrão a partir da análise de Weibull. O peso corpóreo é tomado como uma medição geral de toxicidade.

[000149] Seguindo um protocolo essencialmente conforme descrito acima, o composto do exemplo 16 demonstra atividade antitumor nestes modelos conforme mostrado na tabela 3, desse modo demonstrando que o composto do exemplo 16 tem atividade potente *in vivo* contra uma faixa de tumores de Rb⁺.

[000150] Adicionalmente, nos xenoenxertos de AML MV4-11, a regressão do tumor é observada a uma dose de 100 mg por Kg (mpk), indicativa da atividade inibitória proapoptótica de Pim-1 do composto do exemplo 16, ver tabela 4.

Tabela 3: Retardo de Crescimento de Tumor em modelos de xenoenxerto humano diferente

Xenoenxerto	Dose	TGD Dias (750 m3)	SE
colo-205	100 mpk	39,9	4,6
	50 mpk	17,4	3,2
	25 mpk	15,3	3,8
MV4-11	100 mpk	28,8	1,1
	50 mpk	11,5	4,0
	25 mpk	10,4	4,7
U87 MG	100 mpk	21,4	2,7
	50 mpk	10,0	2,2
	25 mpk	6,1	3,2
H460	100 mpk	6,7	2,7
	50 mpk	4,0	4,2
	25 mpk	1,5	1,8

Tabela 4: atividade Antitumor do composto do exemplo 16 no modelo MV4-11

Tratamento	Volume do Tumor (mg) no início do período de dosagem (dia 28)	SE (mg)	Valor p	Volume do Tumor (mg) no final do período de dosagem (dia 49)	SE (mg)	Valor p
Veículo, 0,2 ml, PO, dose qdx21/1% HEC + 0,1%AF em 25 mM de PB pH 2	219,45	17,42	Ctrl	1271,15	100,9	Ctrl
Composto do exemplo 16, 100 mpk, PO, dose qdx21	225,94	29,61	NS	116,68	15,29	***

[000151] Medições do volume do tumor. O valor P é a significância estatística comparada ao grupo de controle de veículo (Ctrl) no dia de medição- NS, não significante; ***: $p \leq 0,001$.

Modelo de Xenoenxerto de Cérebro Ortotópico

[000152] Modelo de tumor de cérebro *in vivo*: ratos machos NIH-RNU pesando entre 225 e 300 g são anestesiados com isoflurano e colocados em uma estrutura estereotática (David Kopf Instruments, Tujunga, CA). Uma incisão de linha média é feita e um furo de rebarba de 1 mm perfurado 2 mm lateral a partir da linha média e 3 mm anterior à sutura coronal. Uma suspensão de célula de 5×10^5 de células de tumores de glioblastoma humano nU87 MG (crescidas em Eagle's MEM com Sais de Earle, L-glutamina e amino ácidos não essenciais, 1 mM de piruvato de Na e 10% FBS) em 10 μ L (5×10^5 células para dosagem qd e 1×10^6 para dosagem q2d) é injetado a uma profundidade de 3 mm por meio de uma seringa Hamilton 25 ou 50 μ l por um período de aproximadamente 2 minutos usando uma bomba de seringa montada estereotática (Nano-Injector, modelo #53310 e Grampo Adaptador Estereotática, parte #51681, Stoelting Co, Wood Dale, IL) com a seringa deixada no lugar por um adicional de 1 minuto para prevenir fluxo de retorno e a seringa é vagarosamente retirada. O furo é vedado com cera de osso, o campo de operação lavado com solução salina e a incisão fechada com suturas ou grampos.

[000153] O composto de teste é formulado no veículo (1% p/v de hidroxietilcelulose/0,25% v/v de polisorbato 80/0,05% v/v de antiespuma em água purificada) e administrado todo dia por 21 dias a 20, 40 e 80 mpk (qdx21) e 80 mpk q2dx10 começando no dia 4 após implante do tumor.

[000154] A variável de resultado primária é sobrevivência. Os animais são monitorados diariamente até morte e, na consulta com o

grupo de veterinário e em aderência com a política de implante de tumor, eutanizado se o animal torna-se moribundo. As células são implantadas no lóbulo frontal de modo a minimizar disfunção de cérebro potencial tais como déficits motores e controle de funções vitais. Os tumores de lóbulo frontal em humanos são referidos para serem "inativos", que são os sintomas de apresentação mais comuns incluem dor de cabeça, náusea, vômito e déficits cognitivos. A morbidez é, portanto, mais provavelmente para se manifestar como letargia e perda de peso corpóreo. Os dados de sobrevivência são analisados pelo método de Kaplan-Meier para análise de sobrevivência média usando JMP v6.0.2 (SAS Institute).

[000155] Seguindo um protocolo essencialmente conforme descrito acima, o composto do exemplo 16 resultou em um aumento estatisticamente significativo em sobrevivência média (quando comparado a animais tratados com veículo) nas seguintes doses; 40 mpk qd, 80 mpk qd e 80 mpk q2d, (vide tabela 5), desse modo demonstrando que o composto do exemplo 16 é capaz de cruzar a barreira sangue-cérebro e ter atividade inibitória potente *in vivo* em um modelo de xenoenxerto de tumor de glioblastoma ortotópico.

Tabela 5: Sobrevivência Média & Mediana (dias) resultante da administração do composto do exemplo 16.

Grupo de Tratamento	Sobrevivência média (dias)	Erro-padrão (dias)	Ranque de Valor p Log	Sobrevivência Mediana (dias)
Veículo PO qd	25,1	2,8	-	27
PO 20mg/kg qd	29,8	0,7	0,5	31
PO 40mg/kg qd	34,3	1,7	0,0316	37
PO 80mg/kg qd	36,9	1,3	0,0006	37
Veículo PO q2d	23,0	3,5	-	24
PO 80mg/kg q2d	33,0	1,2	0,0295	34

[000156] Em um experimento separado, para determinar plasma do

composto e níveis de exposição do cérebro, aos ratos Sprague Dawley machos suportando não tumor são administrados uma dose única do composto do exemplo 16 oralmente a 30 mg/kg. As amostras são tomadas por 48 horas de modo a determinar concentrações de plasma e cérebro. Os animais são sacrificados, e o sangue total coletado por punção cardíaca e plasma isolado por centrifugação. O cérebro total é coletado e congelado em nitrogênio líquido.

[000157] Amostras de cérebro são preparadas por homogeneização em 80% de metanol/20% de H₂O. Um composto-padrão interno em acetonitrila/metanol (1:1, v/v) é adicionado às amostras de homogenado de plasma ou cérebro para precipitar proteína e as amostras são centrifugadas antes da análise. Os sobrenadantes são analisados por injeção e eluição de gradiente rápido em uma coluna Javelin Betasil C18 (cartucho 20 x 2,1 mm, Fase móvel A: Água/1 M de NH₄HCO₃, 2000:10 v/v, Fase Móvel B: MeOH/1 M NH₄HCO₃, 2000:10 v/v). Os analitos eluídos são detectados por análise de LC-MS-MS usando um espectrômetro de massa quadripolar triplo Sciex API 4000. As concentrações de compostos em plasma ou cérebro são determinadas de preparados-padrão sob condições idênticas.

[000158] As concentrações de plasma e cérebro são determinadas neste estudo de um grupo de três ratos em cada ponto de tempo (vide tabelas 6a e 6b) e são usadas para calcular a área sob a concentração de plasma/curva de tempo ou a concentração de cérebro/curva de tempo de 0 a 48 horas. O exame da proporção de exposição no cérebro ou usando a área sob a curva (AUC) ou concentrações máximas de plasma e cérebro (C_{máx}), vide tabela 6c, demonstra que o composto se distribui bem no cérebro com uma proporção de cérebro/plasma de aproximadamente 1. As concentrações máximas (T_{máx}) são detectadas em 4 horas. Estes experimentos demonstram que o composto do exemplo 16 é capaz de atravessar a barreira

sangue-cérebro e se distribui bem no cérebro. Em contraste, os presentes inventores determinaram que um composto preferido de WO 03/062236 (6-acetil-8-ciclopentil-5-metil-2-(5-piperazin-1-il-piridin-2-ilamino)-8*H*-pirido[2,3-*d*]pirimidin-7-ona) exibe proporções de distribuição de cérebro:plasma de 0,17 (AUC) e 0,1 (C_{máx}) no mesmo ensaio, indicando que o composto se distribui relativamente pobremente no tecido do cérebro neste modelo.

Tabela 6a: Concentrações de plasma do composto do exemplo 16 (ng/mL) determinadas em ratos SD machos

Tempo (h)	2	4	24	48
Média	1014	1504	1018	972,0
S.D.	288,0	134,8	236,2	666,0
%CV	28,4	9,0	23,2	68,5
N	3	3	3	3

Tabela 6b: Concentrações de cérebro do composto do exemplo 16 (ng/g) determinadas nos ratos SD machos

Tempo (h)	2	4	24	48
Média	758,5	1500	992,4	718,0
S.D.	82,38	268,9	54,83	232,0
%CV	10,86	17,93	5,525	32,31
N	3	3	3	3

Tabela 6c: Exposição média ao composto do exemplo 16 em plasma e cérebro determinada em ratos SD machos

Parâmetro	Unidades	Plasma	Cérebro	Proporção de Cérebro/Plasma
AUC	ng*Horas/mL ou ng*Horas/g	52300	47900	0,92
Intervalo AUC		(0-48 Horas)	(0-48 Horas)	
C _{máx}	ng/mL ou ng/g	1500	1500	1,0
T _{máx}	Horas	4,00	4,00	

Estudos de Combinação com Temozolomida

[000159] Xenoenxertos subcutâneos U87 MG são crescidos e medidos conforme anteriormente descritos. O composto do exemplo 16 é formulado e administrado conforme anteriormente descrito e dosado oralmente uma vez em um dia dos dias 11-31. Temozolomida

(Schering Corporation) é formulada em 1% w/v de hidroxiethylcelulose/0,25% v/v de polisorbato 80 em água purificada e administrada por injeção interperitoneal nos dias 11 e 18. Uma comparação da atividade de agente simples de temozolomida com um tratamento de combinação com o composto do exemplo 16 é mostrada na tabela 7. O crescimento do tumor é analisado por análise de interação de 2 vias; volumes de tumor log-transformados foram analisados com uma análise de medições repetida de variância (ANOVA) usando um modelo de correlação de energia espacial em SAS, versão 9.1 (Cary, NC). Uma estrutura fatorial 2 x 2 foi usada para estimar os efeitos do tratamento e o efeito de interação entre os dois tratamentos. O efeito de interação foi testado através de todos os pontos de tempo (teste "total") e em cada ponto de tempo. A inibição aumentada de crescimento de tumor vista nos grupos de combinação comparada àqueles que receberam temozolomida sozinhos indica que a temozolomida e o composto do exemplo 16 demonstra atividade anti-tumor potente *in vivo* em combinação em um modelo de xenoenxerto de tumor de glioblastoma subcutâneo.

Tabela 7: Estudo de Combinação de Xenoenxerto U87-MG do composto do exemplo 16 e temozolomida

Tratamento	Volume do Tumor (mg) no final do período de dosagem (dia 31)	SE (mg)	Valor P
Veículo, 0,2 ml, PO, qdx21/1% HEC + 0,1% AF in 25 mM PB pH 2	456,54	169,3	Ctrl
Temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	101,88	44,16	**
Composto do exemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	30,22	7,57	***

[000160] Medições do volume de tumor. O valor P é a significância estatística comparada ao grupo de controle de veículo (Ctrl) no dia de medição- **: 0,001 < p ≤ 0,01; ***: p ≤ 0,001.

[000161] Xenoenxertos de cérebro ortotópico U87 MG são crescidos

e sobrevivência medida conforme anteriormente descrito. Os grupos de animais são tratados com temolozomida (TMZ), ou uma combinação do exemplo 16 (todo dia ou dia sim dia não de dosagem) mais temozolomida. Conforme mostrado na tabela 8, o aumento na sobrevivência média nos grupos de combinação comparado àqueles que receberam temozolomida sozinho indica que temozolomida e o composto do exemplo 16 tem atividade inibitória potente *in vivo* em combinação em um modelo de xenoenxerto de glioblastoma ortotópico. A ausência de mortalidade e perda de peso corpóreo (vide tabela 9) para tratamentos de combinação indica que eles são bem tolerados e que não existem toxicidades de sobreposição.

Tabela 8: Sobrevivência Média & Mediana (dias) resultante da administração do composto do exemplo 16 em combinação com temozolomida.

Grupo de Tratamento	Sobrevivência Média (dias)	Erro-Padrão (dias)	Ranque de valor p Log	Sobrevivência Mediana (dias)
Veículo PO 1mL/kg qdx20	28,1	1,9	-	30
Temozolomida (TMZ) IP 3 mg/kg (dias 6 e 13)	46,9	3,3	<0,0001	47
Composto do exemplo 16 40mg/kg qdx20 + TMZ IP 3mg/kg (Dias 6 & 13)	60,1	3,6	0,0002	61
Composto do exemplo 16 40mg/kg q2dx10 + TMZ IP 3mg/kg (Dias 6 & 13)	70,5	4,4	0,0032	70

Tabela 9: Mortalidade e peso corpóreo de animais a partir da temozolomida/Estudo do composto do Exemplo 16

Tratamento	Perda de peso corpóreo máxima(%)	Animais mortos/total
Veículo, 0,2 ml, PO, qdx21/1% HEC + 0,1% AF em 25 mM PB pH 2	0	0/8
Temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	-1	0/8
Composto do exemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/temozolomida, 3 mpk, IP, q7dx2	-1	0/8

Estudos de Combinação com Gemcitabina

[000162] Xenoenxertos subcutâneos Calu-6 (pulmão) são crescidos e medidos conforme anteriormente descrito. Gemcitabina foi formulada em salina (0,9% de cloreto de sódio em água purificada) e administrada via injeção intraperitoneal q3dx7. O composto de teste foi administrado qdx21. Uma comparação da atividade de agente simples da gemcitabina com tratamentos de combinação contendo ambos gemcitabina e o composto do exemplo 16 é mostrada na tabela 10. O crescimento do tumor é analisado por análise de interação de 2 vias. A inibição aumentada de crescimento de tumor vista nos grupos de combinação comparados àqueles que receberam gemcitabina indica que as drogas demonstram atividade antitumor potente *in vivo* em combinação em um modelo de xenoenxerto de câncer de pulmão subcutâneo. A baixa incidência de mortalidade e perda de peso corpóreo para os tratamentos de combinação indicam que eles são bem tolerados e não sugerem toxicidades de sobreposição (vide tabela 11).

Tabela 10: Combinação de estudo de xenoenxerto Calu-6 do composto do exemplo 16 e gemcitabina

Tratamento	Volume do tumor (mg) no final do período de dosagem (dia 38)	SE (mg)	Valor p
Veículo, 1% de HEC em 25 mM de PB pH 2, 0,2 ml, PO, qdx21/salina, 0,2 ml, IP, q3dx7	949,73	202,66	Ctrl

Tratamento	Volume do tumor (mg) no final do período de dosagem (dia 38)	SE (mg)	Valor p
Gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	509,18	64,89	**
Composto do exemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/Gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	234,94	30,86	***

[000163] Medições do volume do tumor. O valor P é a significância estatística comparada a grupo de controle de veículo (Ctrl) no dia de medição- **: $0,001 < p \leq 0,01$; ***: $p \leq 0,001$.

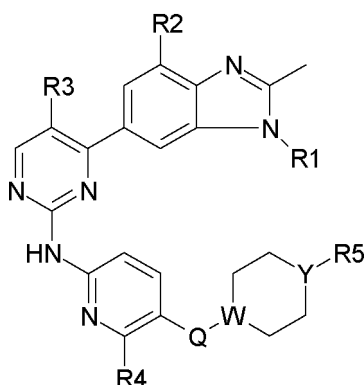
Tabela 11: Mortalidade e peso corpóreo de animais do estudo de gemcitabina/composto do exemplo 16

Tratamento	Perda de peso corpóreo máxima(%)	Animais Mortos/totais
Veículo, 1% de HEC em 25 mM de PB pH 2, 0,2 ml, PO, qdx21/salina, 0,2 ml, IP, q3dx7	0	0/7
Composto do exemplo 16, 50 mpk, PO, qdx21/Gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	-14	1/7
Gemcitabina, 60 mpk, IP, q3dx7	-12	0/7

[000164] A administração oral dos compostos da presente invenção é preferida. A administração intravenosa dos compostos da presente invenção é também preferida. Dependendo das circunstâncias, outras rotas de administração podem ser usadas ou mesmo preferidas. Por exemplo, administração transdermal pode ser muito desejável para pacientes que são esquecidos ou petulantes sobre tomar remédio oral. Os compostos da presente invenção podem também ser administrados por rota percutânea, intramuscular, intranasal ou intrarretal, em circunstâncias particulares. A rota de administração pode ser variada de qualquer modo, limitada pelas propriedades físicas das drogas, a conveniência do paciente e a pessoa que cuida, e outras circunstâncias relevantes (Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Edição, Mack Publishing Co. (1990)).

REIVINDICAÇÕES

1. Composto, caracterizado pelo fato de que apresenta a Fórmula:



na qual

R1 é C₃-C₅ alquila, C₃-C₅ cicloalquila ou ciclopropil-metila;

R2 e R3 são H ou flúor, em que pelo menos um de R2 ou R3 é flúor;

R4 é H ou CH₃;

R5 é C₁-C₆ alquila ou -NR₆R₇ em que R6 e R7 são C₁-C₃ alquila;

Q é CH₂, O, S ou uma ligação direta; e

W e Y são C ou N, em que pelo menos um de W ou Y é N, e em que quando Q é O ou S, W é C;

ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

2. Composto, de acordo com a reivindicação 1, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R1 é isopropila, ciclopropila, ciclopentila ou ciclopropil-metila.

3. Composto, de acordo com a reivindicação 1 ou 2, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R2 e R3 são cada flúor.

4. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R4 é H.

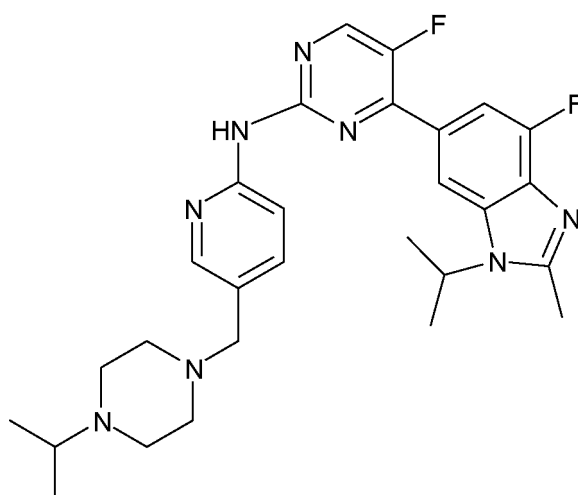
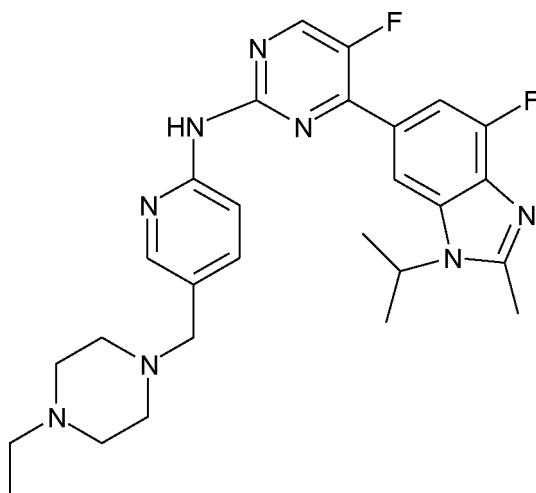
5. Composto, de acordo com qualquer uma das

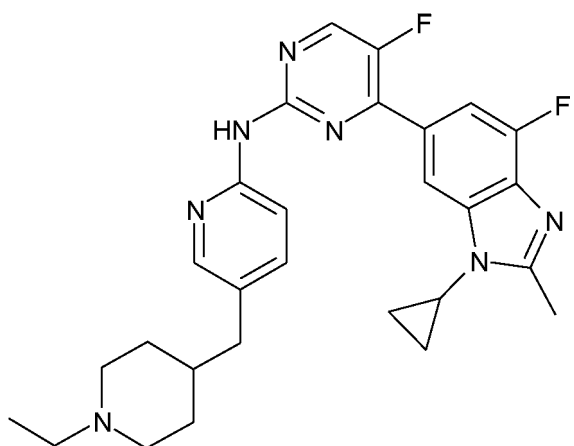
reivindicações 1 a 4, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R5 é C₁-C₃ alquila.

6. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que Q é CH₂.

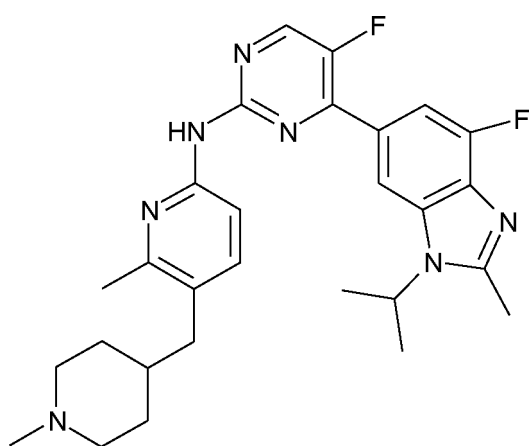
7. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que W é N.

8. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que é selecionado a partir do grupo compreendendo:

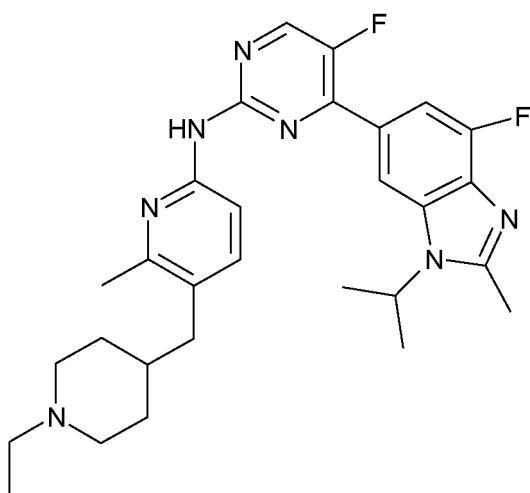




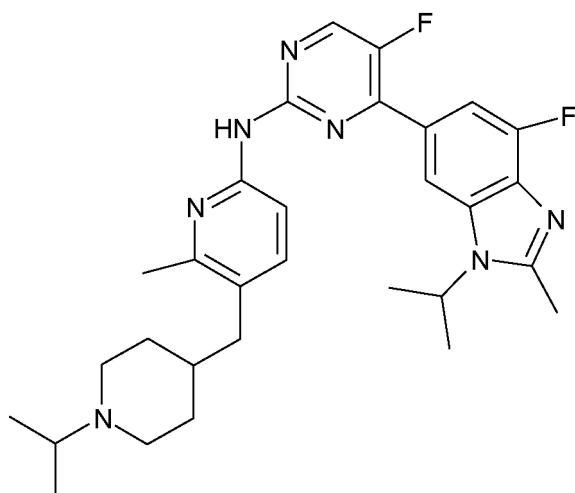
,



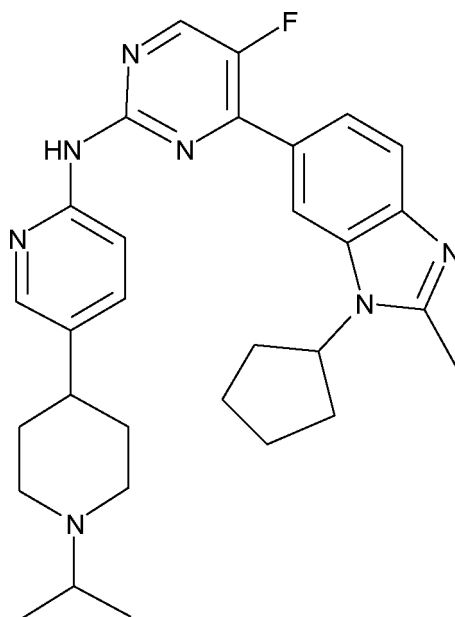
,



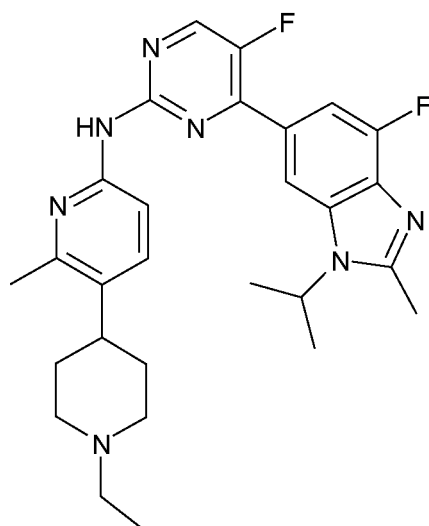
,



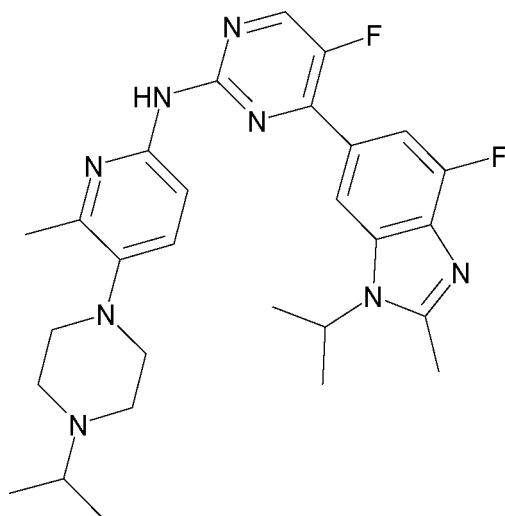
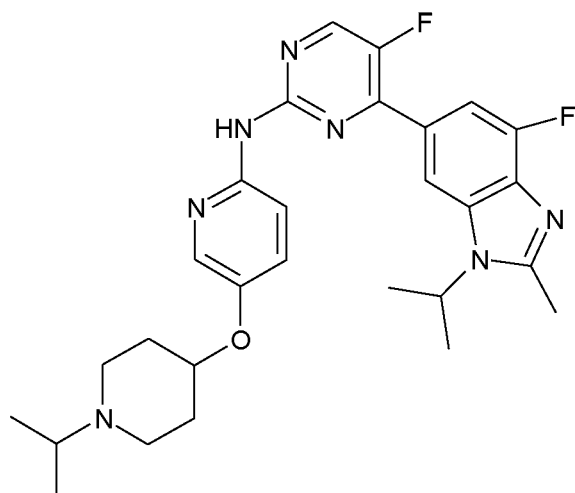
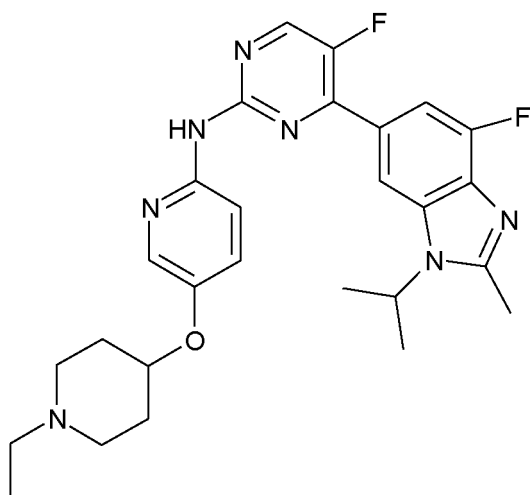
,

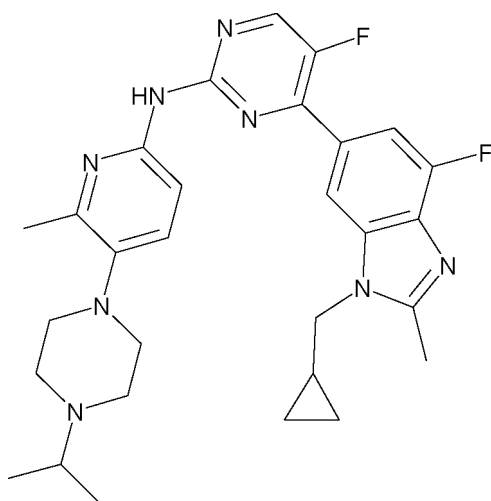


,

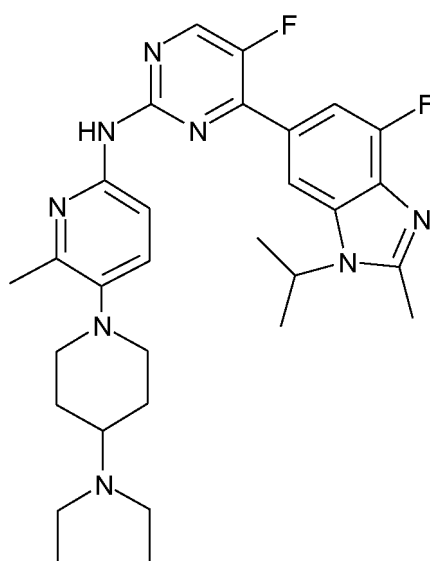


,

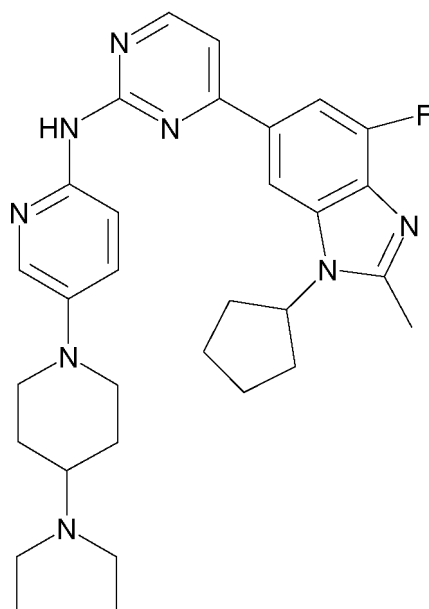




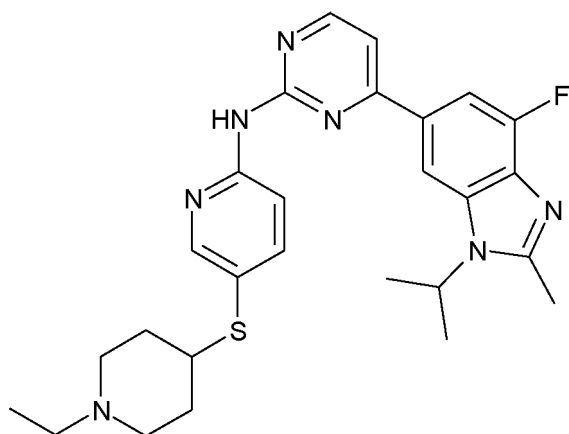
,



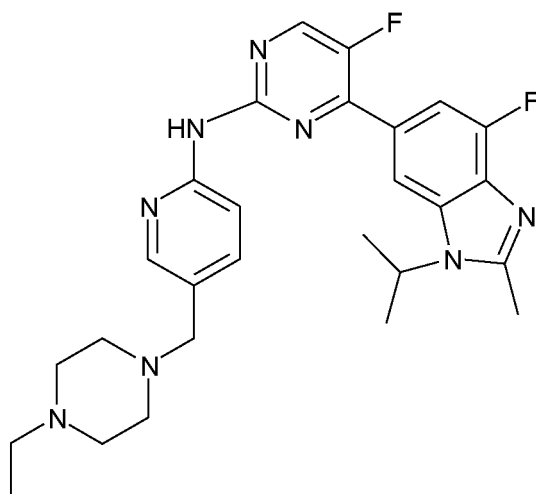
,



e



9. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizado pelo fato de que é:



ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

10. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizado pelo fato de que é o sal de mesilato.

11. Forma cristalina, caracterizada pelo fato de que é forma cristalina III de [5-(4-Etil-piperazin-1-ilmetil)-piridin-2-il]-[5-fluoro-4-(7-fluoro-3-isopropil-2-metil-3H-benzoimidazol-5-il)-pirimidin-2-il]-amina, definida por um modelo de difração de pó de raios X (radiação de $\text{CuK}\alpha$, $\lambda = 1,54056 \text{ \AA}$) compreendendo um pico em 21,29 ($2\theta \pm 0,1^\circ$), e um ou mais picos selecionados a partir do grupo compreendendo 11,54, 10,91 e 12,13 ($2\theta \pm 0,1^\circ$), e

definida por um espectro de ^{13}C RMN compreendendo picos de alteração química $\nu(\text{F1})$ [ppm] a 112,7, 127,3 e 129,4.

12. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, e um veículo, diluente ou excipiente farmaceuticamente aceitáveis.

13. Formulação farmacêutica, caracterizada pelo fato de que compreende um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, junto com um veículo farmaceuticamente aceitável e, opcionalmente, outros ingredientes terapêuticos.

14. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que é para uso em terapia.

15. Composto, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que é para uso no tratamento de um câncer selecionado a partir do grupo consistindo em câncer colorretal, câncer de seio, câncer de pulmão, câncer de próstata, glioblastoma, linfoma de célula do manto, leucemia mieloide crônica e leucemia mieloide aguda.

16. Uso de um composto, como definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, ou de um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que é na preparação de uma formulação farmacêutica para uso em terapia.