



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

(11) BR 112015017331-4 B1



(22) Data do Depósito: 22/01/2014

(45) Data de Concessão: 11/01/2022

(54) Título: COMPOSTOS DE FORMULA I, FORMA CRISTALINA, USO DOS COMPOSTOS, COMBINAÇÃO E COMPOSIÇÃO

(51) Int.Cl.: C07D 413/14; A61K 31/4245; A61K 31/4196; A61K 31/497; A61P 35/00.

(30) Prioridade Unionista: 23/01/2013 EP 13305078.1.

(73) Titular(es): ASTRAZENECA AB.

(72) Inventor(es): BERNARD CHRISTOPHE BARLAAM; DAVID BERRY; BENEDICTE DELOUVRIE; CRAIG STEVEN HARRIS; CHRISTINE MARIE PAUL LAMBERT-VAN DER BREMPT; GILLES OUVRY; GARY PATRICK REID; GARY PETER TOMKINSON.

(86) Pedido PCT: PCT GB2014050163 de 22/01/2014

(87) Publicação PCT: WO 2014/114928 de 31/07/2014

(85) Data do Início da Fase Nacional: 21/07/2015

(57) Resumo: COMPOSTOS DE FORMULA I, FORMA CRISTALINA, USO DOS COMPOSTOS, COMBINAÇÃO, COMPOSIÇÃO E MÉTODO DE SELEÇÃO PARA TRATAMENTO DE CÂNCER A presente invenção refere-se a compostos de Fórmula (I): (I) ou a sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, em que R1 e R2 têm qualquer um dos significados definidos aqui antes na descrição; a processos para seu preparo, a composições farmacêuticas contendo os mesmos e a seu uso no tratamento de distúrbios proliferativos celulares.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**COMPOSTOS DE FORMULA I, FORMA CRISTALINA, USO DOS COMPOSTOS, COMBINAÇÃO E COMPOSIÇÃO**".

[0001] A presente invenção refere-se a novos determinados derivados de aminopirazina, ou sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, os quais possuem atividade anticâncer e são, conseqüentemente, úteis em métodos de tratamento do corpo de um ser humano ou animal. A invenção também se refere a processos para a fabricação dos ditos derivados de aminopirazina, composições farmacêuticas contendo os mesmos e seu uso em métodos terapêuticos, por exemplo, na fabricação de medicamentos para uso na prevenção ou tratamento de cânceres em um animal de sangue quente, tal como o homem, incluindo uso na prevenção ou tratamento de câncer.

[0002] A presente invenção também se refere a derivados de aminopirazina que são inibidores seletivos da família quinase PI3 de enzimas (a qual é alternativamente conhecida como a família de quinase de 3-fosfatidilinositol ou família PI3K), particularmente das isoformas PI3K- α e PI3K- δ e são, por exemplo, úteis para terapia antitumor.

[0003] Na área de câncer, nos últimos anos, descobriu-se que uma célula se pode tornar cancerosa em virtude da transformação de uma parte de seu DNA em um oncogene, isto é, um gene o qual, quando de ativação, leva à formação de células tumorais malignas (Bradshaw, Mutagenesis, 1986, 1, 91). Vários de tais oncogenes dão origem à produção de peptídeos, os quais são quinases, uma classe de enzimas que são capazes de fosforilação de sua proteína ou substratos lipídicos. Há várias classes de quinases.

[0004] Primeiramente, tirosina quinases, as quais podem ser tirosina quinases receptoras ou tirosina quinases não receptoras. Várias classes de tirosina quinases receptoras são conhecidas (Wilks, Advances in Cancer Research, 1993, 60, 43-73) com base em famílias

de fatores de crescimento, que pode, se ligar à superfície extracelular de diferentes tirosina quinases receptoras; como um exemplo, a classificação inclui tirosina quinases receptoras de Classe I que compreende a família EGF de tirosina quinases receptoras. Tirosina quinases não receptoras estão localizadas intracelularmente; várias classes de tirosina quinases não receptoras são conhecidas, incluindo a família Src, tais como as tirosina quinases Src, Lyn, Fyn e Yes.

[0005] Em segundo, determinadas quinases pertencem à classe de serina/treonina quinases as quais também estão localizadas intracelularmente. Vias de sinalização a serina/treonina quinases incluem a cascata Raf-MEK-ERK e aquelas a jusante de quinase PI3, tais como PDK-1, AKT e mTOR (Blume-Jensen e Hunter, Nature. 2001, 411, 355).

[0006] Sabe-se também que algumas outras quinases pertencem à classe de quinases de lipídios, as quais estão localizadas intracelularmente e estão, conforme para as quinases mencionadas acima, envolvidas na transmissão de sinais bioquímicos, tais como aqueles que influenciam o crescimento e invasão de células tumorais. Várias classes de quinases de lipídios são conhecidas, incluindo a dita família de quinases PI3.

[0007] É agora bem entendido que a desregulação de oncogenes e genes supressores tumorais contribui para a formação de tumores malignos, por exemplo, através de aumento da proliferação celular ou aumento da sobrevivência celular. Sabe-se também agora que vias de sinalização mediadas pela família de quinases PI desempenha um papel central em uma série de processos celulares, incluindo proliferação e sobrevivência, e desregulação destas vias é um fator causal em um amplo espectro de cânceres humanos e outras doenças (Katso *et. al.*, Annual Rev. Cell Dev. Biol. 2001, 17: 615-617 e Foster *et. al.*, J. Cell Science. 2003,116: 3037-3040).

[0008] A família de quinases de lipídios PI3 é um grupo de enzimas que fosforilam a posição 3 do anel de inositol de fosfatidilinositol (**Phosphatidylinositol** - PI). Três grandes grupos de enzimas quinases PI3 são conhecidos, os quais são classificados de acordo com sua especificidade de substrato fisiológico (Vanhaesebroeck *et. al.*, Trends in Biol. Sci. 1997, 22, 267; Engleman *et. al.*, Nature Review Genetics, 2006, 7, 607). Enzimas quinases PI3 de Classe III fosforilam PI apenas. Em contraste, enzimas quinases PI3 de Classe II fosforilam tanto PI quanto PI4-fosfato [daqui em diante abreviado como PI(4)P]. Enzimas quinases PI3 de Classe I fosforilam PI, PI(4)P e PI4,5-bifosfato [daqui em diante abreviado como PI(4,5)P2], embora se acredite que apenas PI(4,5)P2 seja o substrato celular fisiológico. Fosforilação de PI(4,5)P2 produz o segundo mensageiro lipídico PI3,4,5-trifosfato [daqui em diante abreviado como PI(3,4,5)P3]. Membros mais distantemente relacionados desta superfamília são quinases de Classe IV, tais como mTOR e proteína quinase dependente de DNA que fosforila resíduos de serina/treonina dentro de substratos proteicos. A mais estudada e compreendida destas quinases de lipídios são as enzimas quinases PI3 de Classe I.

[0009] Quinases PI3 de Classe I são heterodímeros que consistem em uma subunidade catalítica p110 e uma subunidade reguladora, e a família é ainda dividido em enzimas de Classe Ia e Classe Ib com base nos parceiros reguladores e mecanismo de regulação (Engleman *et. al.*, Nature Review Genetics, 2006, 7, 607). Enzimas de Classe Ia consistem em três subunidades catalíticas distintas (p110 α , p110 β e p110 δ , por nomenclatura definem a isoforma de quinases PI3 como α , β ou δ , respectivamente) que dimerizam com cinco subunidades reguladoras distintas (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β e p55 γ), com todas as subunidades catalíticas sendo capazes de interagir com todos as subunidades reguladoras para formar uma variedade de heterodímeros. En-

zimas quinases PI3 de Classe Ia são geralmente ativadas em resposta a estimulação pelo fator de crescimento de tirosina quinases receptoras através de interação dos domínios SH2 de subunidades reguladoras com resíduos de fosfotirosina específicos de proteínas receptoras ou adaptadoras ativadas, tal como IRS-1. Tanto p110 α quanto p110 β são amplamente expressas em todos os tipos de células e tecidos, enquanto que expressão de p110 δ está mais restrita a algumas populações de leucócitos e células epiteliais. Em contraste, a enzima única de Classe Ib consiste em uma p110 γ que interage com uma subunidade reguladora p101. Além disso, a enzima de Classe Ib é ativada em resposta a sistemas de receptor acoplado à proteína G (**G-Protein Coupled Receptor - GPCR**), bem como pelos mecanismos descritos acima.

[00010] Agora, há evidência considerável que indica que enzimas quinases PI3 de Classe Ia contribuem para a tumorigênese em uma ampla variedade de cânceres humanos, quer direta ou indiretamente (Vivanco e Sawyers, Nature Reviews Cancer, 2002, 2, 489-501). Em particular, o gene PIK3CA, o qual codifica a subunidade catalítica p110 α de quinases PI3, está amplamente implicado em tumorigênese. Mutações pontuais de ativação, mais frequentemente encontradas nos domínios helicoidais ou catalíticos de p110 α , aumentam a atividade de quinases PI3 da holoenzima e podem transformar células. Elas têm sido reportadas, particularmente, como mutações que ocorrem somaticamente em frequências significativas através de uma ampla variedade de tipos de tumores (Samuels *et al.*, Science. 2004, 304, 554; Samuels *et al.*, Cancer Cell. 2005, 7, 561; Engleman *et al.*, Nature Review Genetics. 2006, 7, 607; Zhao L. e Vogt P.K., Oncogene 2008, 27 5486). Mutações relacionadas a tumor em p85 α também foram identificadas em cânceres, tais como aqueles de ovário e cólon (Philp *et al.*, Cancer Research. 2001, 61, 7426-7429). Além disso, a subunidade

p110 α é amplificada em determinados tumores, tais como aqueles de ovário (Shayesteh *et al.*, Nature Genetics. 1999, 21, 99-102) e colo do útero (Ma *et al.*, Oncogene. 2000, 19, 2739-2744).

[00011] Além dos efeitos diretos, acredita-se que a ativação de quinases PI3 de Classe Ia contribui para eventos tumorigênicos que ocorrem a montante em vias de sinalização, por exemplo, por meio de ativação dependente de ligante ou independente de ligante de tirosina quinases receptoras, sistemas de GPCR ou integrinas (Vara *et al.*, Cancer Treatment Reviews. 2004, 30, 193-204). Exemplos de tais vias de sinalização a montante incluem superexpressão da tirosina quinase receptora Erb2 em uma variedade de tumores, levando à ativação de vias mediadas por quinases PI3 (Harari *et al.*, Oncogene, 2000, 19, 6102-6114) e superexpressão do oncogene Ras (Kauffmann-Zeh *et al.*, Nature, 1997, 385, 544-548). Além disso, quinases PI3 de Classe Ia podem contribuir para a tumorigênese provocada por vários eventos de sinalização a jusante. Por exemplo, a perda do efeito da fosfatase supressora de tumor PTEN que catalisa a conversão de PI(3,4,5)P3 novamente em PI(4,5)P2 está associada a uma variedade muito ampla de tumores através de desregulação de produção mediada por quinases PI3 de PI(3,4,5)P3 (Simpson e Parsons, Exp. Cell Res., 2001, 264, 29-41). Além disso, acredita-se que aumento dos efeitos de outros eventos de sinalização mediados por quinases PI3 contribui para uma variedade de cânceres, por exemplo, através de ativação de Akt (Nicholson e Anderson, Cellular Signalling, 2002, 14, 381-395).

[00012] Consequentemente, a desregulamentação comum de quinases PI3 em conjunto com aquela de vias de sinalização a montante e a jusante a torna, coletivamente, uma das vias mais comumente desreguladas em câncer humano (Hennessey *et al.*, Nature Reviews Drug Discovery, 2005, 4, 988).

[00013] Além de um papel em mediação de sinalização proliferação

e sobrevivência em células tumorais, também há boas evidências de que enzimas quinases PI3 de Classe Ia também contribuirão para a tumorigênese através de sua função em células estromais associadas a tumor. Por exemplo, sinalização a quinases PI3 é conhecida por desempenhar um papel importante em mediação de eventos angiogênicos em células endoteliais em resposta a fatores pró-angiogênicos, tal como VEGF (Abid *et. al.*, Arterioscler. Thromb. Vase. Biol., 2004, 24, 294-300). Uma vez que enzimas quinases PI3 de Classe I também estão envolvidas em motilidade e migração (Sawyer, Expert Opinion Investig. Drugs, 2004, 1-3, 1-19), inibidores de quinases PI3 forneceria benefícios terapêuticos ao inibir a invasão de células tumorais e metástases.

[00014] Além disso, as enzimas quinases PI3 de Classe I desempenham um papel importante na regulação de células imunes com atividade de quinases PI3 contribuem para efeitos pró-tumorigênicos de células inflamatórias (Coussens e Werb, Nature, 2002, 420, 860-867). Na verdade, as enzimas quinases PI3 de Classe Ia, quinases PI3 δ , estão particularmente implicadas na tumorigênese em malignidades hematológicas, tais como leucemia linfocítica crônica (**C**hronic **L**ymphocytic **L**eukemia - CLL), leucemia linfoblástica aguda (**A**cute **L**ymphoblastic **L**eukemia - ALL) e linfoma de células do manto (**M**antle **C**ell **L**ymphoma - MCL). Sinalização elevada de PI3K (principalmente p110 δ) é reportada em uma ampla variedade de células linfoides malignas (Herman *et al.*, Blood 2010, 116, 2078; Ikeda *et al.*, Blood 2010, 116, 1460; Uddin *et al.*, Blood, 2006, 108, 4178; Rudelius *et. al.*, Blood; 2006, 108, 1668; Garcia-Martinez. Br J Cancer 2011, 104, 1116; Renne *et. al.*, 2007 Leukemia, 2, 780). Isto levou ao desenvolvimento de agentes de objetivação de quinases PI3 δ , com resultados clínicos iniciais promissores em doenças malignas hematológicas (Castillo *et. al.*, Expert Opinion on Investigational Drugs, 2012, 21, 15).

[00015] Estes resultados sugerem que inibidores farmacológicos de enzimas quinases PI3 de Classe I podem ser de utilidade terapêutica para o tratamento das várias formas da doença cancerosa compreendendo tumores sólidos, tais como carcinomas e sarcomas, e as leucemias e malignidades linfoides.

[00016] Os primeiros estudos, tanto pré-clínicos quanto clínicos, que exploraram os papéis fisiológicos e patológicos da enzima quinase PI3, usaram grandemente agentes com seletividade de inibição de quinase limitada, se estendendo através das famílias de quinase mais amplas, através de toda a família de quinases PI3 ou através de toda a família de quinases PI3 de Classe I. Consequentemente, há uma necessidade por inibidores farmacêuticos de quinases PI3 de Classe I mais seletivos para proporcionar agentes terapêuticos úteis com potencial para conferir uma margem terapêutica otimizada em relação aos agentes iniciais que entraram em uso clínico.

[00017] Em geral, os compostos da presente invenção possuem atividade inibidora potente contra um subconjunto das enzimas quinases PI3 de Classe I, em particular contra as isoformas α e δ de quinases PI3 de Classe Ia, com preservação relativa da isoforma γ e, particularmente, β . Os compostos também são seletivos contra a família mais ampla de quinases PI3 e o quinoma mais amplo. Tais compostos possuem uma potência suficiente contra enzimas quinases PI3 de Classe I, uma vez que eles podem ser usados em uma quantidade suficiente para inibir um subconjunto de isoformas de quinases PI3 de Classe I, particularmente inibir as isoformas α e δ de enzimas quinases PI3 de Classe I, ao mesmo tempo em que demonstram pouca atividade contra outras quinases.

[00018] A compreensão da desregulação de sinalização a quinases PI3 em câncer humano e outras doenças oferece a perspectiva de objetivação de um subgrupo de pacientes com maior probabilidade de se

beneficiar de tratamento com os agentes descritos na presente Patente através de um processo conhecido como Assistência Médica Personalizada (**P**ersonalised **H**ealth**C**are - PHC) ou Medicina Personalizada. Para estes agentes, pacientes cuja doença depende de sinalização elevada ou de outra forma alterada à PI3K- α e/ou PI3K- δ podem se beneficiar particularmente de tratamento. É bem conhecido na técnica que o diagnóstico pode ser usado para fornecer uma leitura de biomarcador de previsão de resposta. Tais diagnósticos poderiam medir uma ou mais leituras de desregulação da via tais como, porém sem limitações, mutação nos genes de PIK3CA, PTEN ou p85 (PIK3R), aumento ou amplificação no número de cópias do gene de PIK3CA, superexpressão ou atividade elevada das isoformas α e/ou δ de PI3K ou uso de uma leitura de fosfobiomarcador dentro da via, tal como fosfo-RTK ou fosfo-AKT. Além disso, a medição do estado de mutação ou estado de ativação de genes adicionais, tal como Kras, um marcador potencial de resistência em tumores com PIK3CA ou PI3K- α aberrante ou desregulada (Engelman *et al.*, Nature Medicine, 2008, 14, páginas 1351-1355; Ihle *et al.*, Cancer Research 2009, 69, páginas 143-160; Janku *et al.*, Molecular Cancer Therapeutics 2011, 10, páginas 558-564), poderia ajudar a aumentar a previsibilidade de uma abordagem de Medicina Personalizada. Alternativamente, em outra abordagem objetivada, mas menos específica, o tratamento poderia ser focado em subconjuntos de doenças onde se sabe a desregulação das isoformas relevantes de PI3K é mais prevalente.

[00019] Os compostos descritos podem ser usados para objetivar doenças, quer individualmente ou em combinação com outro agente ou agentes farmacêuticos. Combinação de inibidores de quinases PI3 com outras terapias pode melhorar a eficácia ao superar mecanismos de resistência, seja inatos ou induzidos em resposta ao agente contra quinases PI3. Há dados pré-clínicos substanciais para apoiar tal abor-

dagem (Courtney *et. al.*, J Clin Oncol 2010, 28, 1075; Engleman *et. al.*, Nature Review Genetics 2006, 7, 607). Uma abordagem é combinações 'intra-via' com agentes que modulam outros eixos nas vias de sinalização de quinases PI3 (por exemplo, mTOR, AKT, RTK, outro agente contra quinases PI3). Uma segunda abordagem é combinações 'inter-via' onde inibição de mais de uma via de sinalização podem ser benéficas em relação à inibição de uma única via (por exemplo, combinada com inibidores de MEK, inibidores de Raf, moduladores da família Bcl, inibidores de RTK ou moduladores de sinalização de dano ao DNA, tais como os inibidores de PARP). Outras abordagens incluem, onde o inibidor de quinase PI3 é combinado com agentes ou regimes que já estão estabelecidos na prática clínica, as assim denominadas abordagens de Padrão de Tratamento (**Standard of Care - SoC**) ou combinações de agentes que objetivam mecanismos que não células tumorais, tais como células do estroma tumoral ou através do sistema imune.

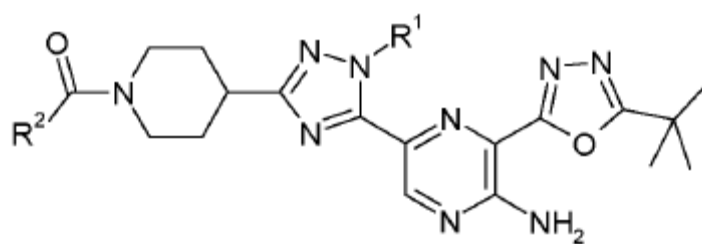
[00020] Além de tumorigênese, há evidências de que enzimas quinases PI3 de Classe I desempenham um papel em outras doenças (Wymann *et. al.*, Trends in Pharmacological Science. 2003, 24, 366-376). Ambas as enzimas quinases PI3 de Classe Ia, em particular PI3K- δ , e a única enzima de Classe Ib (PI3K- γ) têm papéis importantes em células do sistema imune (Koyasu, Nature Immunology. 2003, 4, 313-319) e, assim, elas são alvos terapêuticos para indicações inflamatórias e alérgicas. A inibição de quinases PI3 é também, conforme descrito anteriormente, útil para tratar doença cardiovascular através dos efeitos anti-inflamatórios ou ao afetar diretamente os miócitos cardíacos (Prasad *et. al.*, Trends in Cardiovascular Medicine, 2003, 1-3, 206-212). Assim, inibidores de enzimas quinases PI3 de Classe I podem ser de grande valor na prevenção e tratamento de uma grande variedade de doenças, além de câncer.

[00021] Descobriu-se que os compostos, isto é, os derivados de aminopirazina, da invenção possuem atividade antitumor potente, sendo úteis em inibição de proliferação celular descontrolada que resulta de uma doença maligna. Sem pretender sugerir que os compostos descritos na presente invenção possuem atividade farmacológica apenas em virtude de um efeito sobre um único processo biológico, acredita-se que os compostos conferem um efeito antitumor por meio de inibição das enzimas quinases PI3 de Classe I, particularmente por meio de inibição de um subconjunto de enzimas quinases PI3 de Classe Ia, mais particularmente por meio de inibição das isoformas α e δ de PI3K.

[00022] Os compostos da presente invenção podem também ser úteis em inibição de proliferação celular descontrolada que surge a partir de várias doenças não malignas, tais como doenças inflamatórias (por exemplo, artrite reumatoide e doença inflamatória do intestino), doenças fibróticas (por exemplo, cirrose hepática e fibrose pulmonar), glomerulonefrite, esclerose múltipla, psoríase, hipertrofia prostática benigna (**B**enign **P**rostatic **H**ypertrophy - BPH), reações de hipersensibilidade da pele, doenças dos vasos sanguíneos (por exemplo, aterosclerose e restenose), asma alérgica, diabetes dependente de insulina, retinopatia diabética e nefropatia diabética.

[00023] Amidas de prolina foram descritas como agentes seletivos para PI3K- α pela Novartis nos Pedidos de Patente Internacional WO2009/080705, WO2010/029082 e WO2011/000905. Inibidores de quinase ATR contendo aminopirazina foram descritos nos documentos WO2011/143426 e WO2010/071837 (Vertex).

[00024] De acordo com um aspecto da invenção é proporcionado um composto da Fórmula (I):



(I)

[00025] em que:

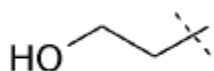
R^1 é metila ou etila; e

R^2 é (C2-3)alquila substituída por hidroxila;

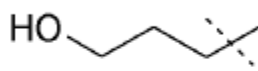
ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

[00026] Em outro aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) conforme definido acima.

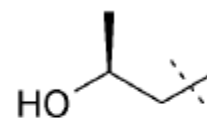
[00027] Será entendido que o termo "(C2-3)alquila substituída por hidroxila" inclui tanto grupos de cadeia linear quanto ramificada, por exemplo, aqueles ilustrados como os grupos (i) a (xi) abaixo:



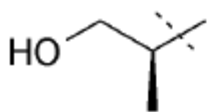
(i)



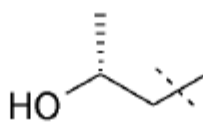
(ii)



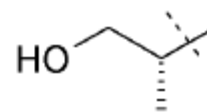
(iii)



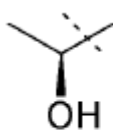
(iv)



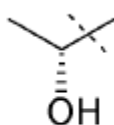
(v)



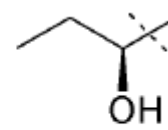
(vi)



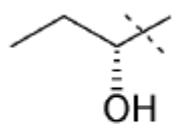
(vii)



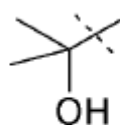
(viii)



(ix)



(x)



(xi)

[00028] Deverá ser entendido que, na medida em que alguns dos compostos de Fórmula (I) definidos acima podem existir em formas opticamente ativas ou racêmicas em virtude de um ou mais átomos de carbono assimétricos, a invenção inclui, em sua definição, qualquer uma de tais formas opticamente ativas ou racêmicas as quais possuem atividade inibidora de PI3K- α e - δ . A síntese de formas opticamente ativas pode ser realizada por meio de métodos atuais de química orgânica bem conhecidos na técnica, por exemplo, através de síntese a partir de materiais de iniciação opticamente ativos ou decomposição de uma forma racêmica. Similarmente, a atividade supracitada pode ser avaliada usando técnicas laboratoriais convencionais.

[00029] Um enantiômero particular de um composto descrito aqui pode ser mais ativo que outros enantiômeros do mesmo composto.

[00030] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é fornecido um composto da Fórmula (I), ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, o qual é um enantiômero único estando em um excesso enantiomérico (% ee) de ≥ 95 , $\geq 98\%$ ou $\geq 99\%$. Convenientemente, o enantiômero único está presente em um excesso enantiomérico (% ee) de $\geq 99\%$.

[00031] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é fornecida uma composição farmacêutica a qual compreende um composto de Fórmula (I) o qual é um enantiômero único estando em um excesso enantiomérico (% ee) de ≥ 95 , $\geq 98\%$ ou $\geq 99\%$, ou um sal é farmaceuticamente aceitável do mesmo, em associação com um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável. Convenientemente, o enantiômero único está presente em um excesso enantiomérico (% ee) de $\geq 99\%$.

[00032] Alguns compostos de Fórmula (I) podem ser cristalinos e podem ter mais de uma forma cristalina. Deverá ser entendido que a presente invenção abrange qualquer forma cristalina ou amorfa, ou misturas das mesmas, formas as quais possuem propriedades úteis na inibição de atividade de PI3K- α e $-\delta$, sendo bem conhecido na técnica como determinar a eficácia de uma forma cristalina ou amorfa para a inibição de atividade de PI3K- α e/ou $-\delta$ por meio dos ensaios convencionais descritos a seguir.

[00033] É geralmente sabido que materiais cristalinos podem ser analisados usando técnicas convencionais, tais como análise de Difração de Pó por Raios X (daqui em diante XRPD - **X-Ray Powder Diffraction**), Calorimetria de Varredura Diferencial (daqui em diante DSC - **Differential Scanning Calorimetry**), Análise Gravimétrica Térmica (daqui em diante TGA - **ThermoGravimetric Analysis**), espectroscopia de Transformação de Fourier de Infravermelho por Reflexão Difusa (DRIFT - **Diffuse Reflectance Infrared Fourier Transform**), espectroscopia próximo do infravermelho (**Near InfraRed - NIR**), espectroscopia por ressonância magnética nuclear em estado em solução e/ou sólido. O teor de água de tais materiais cristalinos pode ser determinado por meio de análise de Karl Fischer.

[00034] Como um exemplo, o composto do Exemplo 1 exibe cristalinidade e uma forma cristalina foi identificada.

[00035] Consequentemente, um outro aspecto da invenção é a Forma A de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona.

[00036] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 5,1^\circ$.

[00037] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 18,0^\circ$.

[00038] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 5,1$ e $18,0^\circ$.

[00039] De acordo com um outro aspecto da presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 5,1, 18,0, 10,2, 11,7, 19,4, 18,5, 14,8, 26,7, 26,6, 17,8^\circ$.

[00040] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X substancialmente igual ao padrão de difração de pó por raios X mostrado na Figura 1.

[00041] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 5,1^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ 2\text{-teta}$.

[00042] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-

butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 18,0^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ 2\text{-teta}$.

[00043] De acordo com um outro aspecto da presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 5,1$ e $18,0^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ 2\text{-teta}$.

[00044] De acordo com um outro aspecto da presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona, a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 5,1, 18,0, 10,2, 11,7, 19,4, 18,5, 14,8, 26,7, 26,6, 17,8^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ 2\text{-teta}$.

[00045] O Exemplo 3 é também cristalino e três formas (A, B e C) são descritas aqui.

[00046] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 4,8^\circ$.

[00047] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 10,0^\circ$.

[00048] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma

cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 4,8^\circ$ e $10,0^\circ$.

[00049] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 4,8, 10,0, 14,6, 5,2, 19,9, 10,4, 25,4, 23,6, 24,4, 16,2^\circ$.

[00050] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X substancialmente igual ao padrão de difração de pó por raios X mostrado na Figura 3.

[00051] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em $2\text{-teta} = 4,8^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ 2\text{-teta}$.

[00052] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em $2\text{-teta} = 10,0^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ 2\text{-teta}$.

[00053] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma

cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em 2-teta = 4,8° e 10,0°, em que os ditos valores podem ser mais ou menos 0,2° 2-teta.

[00054] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma A, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em 2-teta = 4,8, 10,0, 14,6, 5,2, 19,9, 10,4, 25,4, 23,6, 24,4, 16,2°, em que os ditos valores podem ser mais ou menos 0,2° 2-teta.

[00055] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de 2-teta = 5,8°.

[00056] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de 2-teta = 10,9°.

[00057] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em cerca de 2-teta = 5,8° e 10,9°.

[00058] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-

ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em cerca de 2-teta= 5,8, 10,9, 11,5, 25,9, 17,3, 24,0, 19,1, 12,9, 24,7, 27,2°.

[00059] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma B de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X substancialmente igual ao padrão de difração de pó por raios X mostrado na Figura 5.

[00060] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em 2-teta =5,8° mais ou menos 0,2° 2-teta.

[00061] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em 2-teta = 10,9° mais ou menos 0,2° 2-teta.

[00062] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em 2-teta = 5,8° e 10,9° , em que os ditos valores podem ser mais ou menos 0,2° 2-teta.

[00063] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma B, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em 2-teta = 5,8, 10,9, 11,5, 25,9, 17,3, 24,0, 19,1, 12,9, 24,7, 27,2°, em que os ditos valores podem ser mais ou menos 0,2° 2-teta.

[00064] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 6,9^\circ$.

[00065] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em cerca de $2\text{-teta} = 12,3^\circ$.

[00066] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 6,9^\circ$ e $12,3^\circ$.

[00067] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em cerca de $2\text{-teta} = 6,9, 12,3, 10,5, 21,0, 24,6, 13,6, 16,4, 19,6, 20,2, 22,5^\circ$.

[00068] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma C de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X substancialmente igual ao padrão de difração de pó por raios X mostrado na Figura 7.

[00069] De acordo com a presente invenção, é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-

1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em 2-teta = $6,9^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ$ 2-teta.

[00070] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos um pico específico em 2-teta = $12,3^\circ$ mais ou menos $0,2^\circ$ 2-teta.

[00071] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com pelo menos dois picos específicos em 2-teta = $6,9^\circ$ e $12,3^\circ$, em que os ditos valores podem ser mais ou menos $0,2^\circ$ 2-teta.

[00072] De acordo com a presente invenção é fornecida uma forma cristalina, Forma C, de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona a qual tem um padrão de difração de pó por raios X com picos específicos em 2-teta = $6,9$, $12,3$, $10,5$, $21,0$, $24,6$, $13,6$, $16,4$, $19,6$, $20,2$, $22,5^\circ$, em que os ditos valores podem ser mais ou menos $0,2^\circ$ 2-teta.

[00073] Quando se afirma que a presente invenção refere-se a uma forma cristalina de um composto da invenção, tal como o Exemplo 1 ou Exemplo 3, o grau de cristalinidade é, convenientemente, maior do que cerca de 60%, mais convenientemente maior do que cerca de 80%, de preferência maior do que cerca de 90% e, mais preferivelmente, maior do que cerca de 95%. Ainda mais preferivelmente, o grau de cristalinidade é maior do que cerca de 98%.

[00074] Quando se afirma que a presente invenção refere-se a uma forma cristalina de um composto da invenção, tal como no Exemplo 1 ou Exemplo 3, a forma cristalina é, de preferência, substancialmente

isenta de outras formas cristalinas ou formas amorfas do mesmo composto. Neste contexto, "substancialmente isenta" significa, convenientemente, mais de cerca de 60%), mais convenientemente mais de cerca de 80%, de preferência mais de cerca de 90%, mais preferivelmente mais de cerca de 95%, ainda mais preferivelmente mais de cerca de 98% e, mais preferivelmente, mais de cerca de 99% de uma única forma cristalina pura. Por exemplo, o Exemplo 3 pode estar na forma de Forma A e substancialmente isento de Formas B e C; alternativamente, o Exemplo 3 pode estar na forma de Forma B e substancialmente isento de Formas A e C; alternativamente, o Exemplo 3 pode estar na forma de Forma C e substancialmente isento de Formas A e B. Similarmente, o Exemplo 3 pode estar na forma de Forma B e substancialmente isento de formas amorfas ou cristalinas alternativas.

[00075] Deverá ser entendido que os valores 2-teta dos padrões de difração de pó por raios X podem variar ligeiramente de um aparelho para outro ou de uma amostra para outra e, assim, os valores citados não devem ser interpretados como absolutos.

[00076] Sabe-se que pode ser obtido um padrão de difração de pó por raios X o qual tem um ou mais erros de medição, dependendo das condições de medição (tal como equipamento ou máquina usada). Em particular, é geralmente sabido que as intensidades em um padrão de difração de pó por raios X podem flutuar dependendo das condições de medição. Consequentemente, deverá ser entendido que as formas cristalinas da presente invenção descritas acima, salvo indicação em contrário, não estão limitadas aos cristais que fornecem padrões de difração de pó por raios X idênticos aos padrões de difração de pó por raios X mostrados nas Figuras 1,3 e 5 e quaisquer cristais que fornecem padrões difração de pó por raios X substancialmente similares àqueles mostrados nestas Figuras são abrangidos pelo âmbito da presente invenção. Aqueles versados na técnica de difração de pó por

raios X serão capazes de avaliar a identidade substancial de padrões de difração de pó por raios X.

[00077] Aqueles versados na técnica de difração de pó por raios X também perceberão que a intensidade relativa dos picos pode ser afetada, por exemplo, por grãos acima de 30 microns de tamanho e relações entre eixos não unitárias, as quais podem afetar a análise de amostras. Aqueles versados na técnica também perceberão que a posição de reflexões pode ser afetada pela altura precisa na qual a amostra fica no difratômetro e a calibração zero do difratômetro. A planaridade da superfície da amostra pode também ter um pequeno efeito. Consequentemente, os dados de padrão de difração apresentados não são devem ser entendidos como valores absolutos (vide Jenkins, R. & Snyder, R.L., "Introduction to X-Ray Diffractometry", John Wiley & Sons, 1996; Bunn, C.W. (1948), Chemical Crystallography, Clarendon Press, Londres; Klug, H.P. & Alexander, L.E. (1974), X-Ray Diffraction Procedures).

[00078] Em geral, um erro de medição de um ângulo de difração em um difratograma de pó por raios X é de aproximadamente mais ou menos $0,2^\circ 2\text{-teta}$ e tal grau de erro DE medição dev erá ser levado em conta quando se considera os dados de difração de pó por raios X. Além disso, deverá ser entendido que as intensidades podem flutuar dependendo das condições experimentais e do preparo da amostra (orientação preferida).

[00079] Compostos particulares da invenção são cada um dos Exemplos, cada um dos quais constitui um outro aspecto independente da presente invenção. Outros compostos específicos da invenção são sal(is) farmacêuticamente aceitável(is) de cada um dos Exemplos, cada um dos quais constitui outro aspecto independente da presente invenção.

[00080] De acordo com um aspecto adicional da invenção é forne-

cido um composto de Fórmula (I) o qual é obtenível por meio de qualquer um dos Exemplos conforme descrito aqui.

[00081] Uma outra característica é qualquer um dos âmbitos definidos aqui, contanto que Exemplos específicos, tais como os Exemplos 1, 3, 4, etc., sejam individualmente reivindicados.

[00082] Será apreciado por aqueles versados na técnica que determinados compostos de Fórmula (I) contêm átomos de carbono assimetricamente substituídos e, conseqüentemente, podem existir e ser isolados em formas opticamente ativas e racêmicas. Alguns compostos de Fórmula (I) podem exibir polimorfismo. Deverá ser entendido que a presente invenção abrange qualquer forma racêmica, opticamente ativa, polimórfica ou estereoisoméricas, ou misturas das mesmas, formas as quais possuem propriedades úteis na inibição de atividade de PI3K- α e $-\delta$, sendo bem conhecido na técnica como preparar formas opticamente ativas (por exemplo, por meio de decomposição da forma racêmica através de técnicas de recristalização, através de síntese a partir de materiais de iniciação opticamente ativos, através de síntese quiral, através de decomposição enzimática, através de bio-transformação ou através de separação cromatográfica usando uma fase quiral estacionária) e como determinar a eficácia de inibição de atividade de PI3K- α e $-\delta$ por meio de ensaios convencionais descritos a seguir.

[00083] Deverá ser entendido que determinados compostos de Fórmula (I) definidos acima podem exibir o fenômeno de tautomerismo. Deverá ser entendido que a presente invenção inclui, em sua definição, qualquer forma tautoméricas, ou uma mistura das mesmas, a qual possui atividade inibidora de PI3K e não deve estar limitada apenas a qualquer das formas tautoméricas usadas nos desenhos das fórmulas ou indicadas nos Exemplos. Em geral, apenas uma de tais formas tautoméricas é indicada nos Exemplos que seguem depois ou

é apresentada em quaisquer desenhos das fórmulas relevantes que seguem depois.

[00084] A presente invenção se destina a incluir todos os isótopos de átomos que ocorrem nos presentes compostos. Isótopos deverá ser entendido como incluindo os átomos que têm o mesmo número atômico, mas números de massa diferentes. Por exemplo, os isótopos de hidrogênio incluem trítio e deutério. Os isótopos de carbono incluem ^{13}C e ^{14}C .

[00085] Um sal farmacologicamente aceitável adequado de um composto de Fórmula (I) é, por exemplo, um sal de adição de ácido de um composto de Fórmula (I), por exemplo, um sal de adição de ácido com um ácido inorgânico ou orgânico forte, tal como ácido clorídrico, ácido bromídrico, ácido sulfúrico ou ácido trifluoroacético. Um outro sal farmacologicamente aceitável adequado de um composto de Fórmula (I) é, por exemplo, um sal formado no interior do corpo de um ser humano ou animal após administração de um composto de Fórmula (I).

[00086] Deverá ser ainda entendido que um solvato farmacologicamente aceitável adequado de um composto de Fórmula (I) também constitui um aspecto da presente invenção. Um solvato farmacologicamente aceitável adequado é, por exemplo, um hidrato, tal como um hemi-hidrato, um mono-hidrato, um di-hidrato ou um tri-hidrato ou uma quantidade alternativa dos mesmos.

[00087] Deverá ainda ser entendido que um profármaco farmacologicamente aceitável adequado de um composto de Fórmula (I) também constitui um aspecto da presente invenção. Conseqüentemente, os compostos da invenção podem ser administrados na forma de um profármaco, o qual é um composto que é quebrado no corpo de um ser humano ou animal para liberar um composto da invenção. Um profármaco pode ser usado para alterar as propriedades físicas e/ou as propriedades farmacocinéticas de um composto da invenção. Um profár-

maco pode ser formado quando o composto da invenção contém um grupo ou substituinte adequado ao qual pode ser ligado grupo de modificação de propriedades. Exemplos de profármacos incluem derivados de éster cliváveis *in vivo* que podem ser formados em um grupo hidróxi em um composto de Fórmula (I) derivados de amida cliváveis *in vivo* que podem ser formados em um grupo amino em um composto de Fórmula (I).

[00088] Consequentemente, a presente invenção inclui aqueles compostos da Fórmula (I) conforme definido aqui antes quando tornados disponíveis por meio de síntese orgânica e quando tornados disponíveis no interior do corpo de um ser humano ou animal por meio de clivagem de um profármaco dos mesmos. Consequentemente, a presente invenção inclui aqueles compostos da Fórmula (I) que são produzidos através de meios sintéticos orgânicos e também aqueles compostos que são produzidos no corpo de um ser humano ou animal através de metabolismo de um composto precursor, o qual é um composto de Fórmula (I) que pode ser um composto produzido sinteticamente ou um composto produzido metabolicamente.

[00089] Um profármaco farmacologicamente aceitável adequado de um composto de Fórmula (I) é um que se baseia no julgamento médico razoável como sendo adequado para administração ao corpo de um ser humano ou animal sem atividades farmacológicas indesejáveis e sem toxicidade indevida.

[00090] Várias formas de profármaco foram descritas, por exemplo, nos documentos a seguir:

[00091] Methods in Enzymology. Vol. 42, páginas 309-396, editado por K. Widder *et al.* (Academic Press, 1985);

[00092] Design of Pro-drugs, editado por H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);

[00093] A Textbook de Drug Design and Development, editado por

Krogsgaard-Larsen e H. Bundgaard, Capítulo 5, "Design and Application of Pro-drugs", por H. Bundgaard páginas 113-191 (1991);

[00094] H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);

[00095] H. Bundgaard *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988);

[00096] N. Kakeya *et al.*, Chem. Pharm. Bull, 32, 692 (1984);

[00097] T. Higuchi e V. Stella, "Pro-Drugs as Novel Delivery Systems", A.C.S. Symposium Series, Volume 14; e

[00098] E. Roche (editor), "Bioreversible Carriers in Drug Design", Pergamon Press, 1987.

[00099] Um profármaco farmacologicamente aceitável adequado de um composto de Fórmula (I) que possui um grupo hidróxi é, por exemplo, um éster ou éter clivável *in vivo* do mesmo. Um éster clivável ou éter *in vivo* de um composto de Fórmula (I) contendo um grupo hidróxi é, por exemplo, um éster ou éter farmacologicamente aceitável que é clivado no corpo de um ser humano ou animal para produzir o composto de hidróxi precursor. Grupos formadores de ésteres farmacologicamente aceitáveis adequados para um grupo hidróxi incluem ésteres inorgânicos, tais como ésteres de fosfato (incluindo os ésteres cíclicos fosforâmídicos). Além disso, grupos formadores de éster farmacologicamente aceitáveis adequados de um grupo hidróxi incluem grupos (1-10C) alcanoíla, tais como grupos acetila, benzoíla, fenilacetila e benzoíla e fenilacetila substituídos, grupos (1-10C) alcóxicarbonila, tais como grupos etóxicarbonila, *N,N*-[di-(1-4C)alquil]carbamoíla, 2-dialquilaminoacetila e 2-carboxiacetila. Exemplos de substituintes de anel nos grupos fenilacetila e benzoíla incluem aminometila, *N*-aminometila, *N,N*-dialquilaminometila, morfolinometila, piperazin-1-ilmetila e 4-(1-4C)alquilpiperazin-1-ilmetila. Grupos formadores de éter farmacologicamente aceitáveis adequados para um grupo hidróxi inclu-

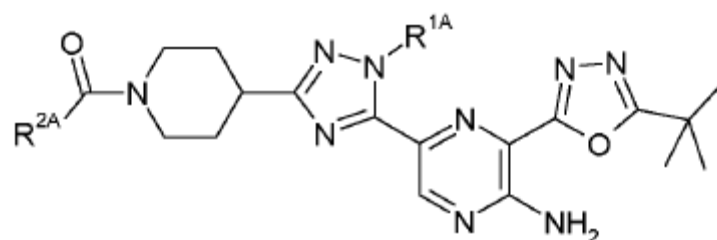
em grupos α -aciloxialquila, tais como grupos acetoximetila e pivailoximetila.

[000100] Um profármaco farmacologicamente aceitável adequado de um composto de Fórmula (I) que possui um grupo amino é, por exemplo, um derivado de amida clivável *in vivo*. Amidas farmacologicamente aceitáveis adequadas de um grupo amino incluem, por exemplo, uma amida formada com grupos (1-10C) alcanoíla, tais como grupos acetila, benzoíla, fenilacetila e benzoíla e fenilacetila substituídos. Exemplos de substituintes de anel nos grupos fenilacetila e benzoíla incluem aminometila, *N*-alquilaminometila, *N,N*-dialquilaminometila, morfolinometila, piperazin-1-ilmetila e 4-(1-4C)-ilmetil alquilpiperazin-1.

[000101] Os efeitos *in vivo* de um composto de Fórmula (I) podem ser exercidos, em parte, por um ou vários metabólitos que são formados no interior do corpo de um ser humano ou animal após administração de um composto de Fórmula (I). Conforme afirmado aqui antes, os efeitos *in vivo* de um composto de Fórmula (I) também podem ser exercidos por meio do metabolismo de um composto precursor (um profármaco).

[000102] Os compostos de Fórmula (I) contêm uma subunidade de piperidina substituída por $-C(O)R^2$, em que R^2 é (C2-3)alquila substituída por hidroxila. Uma via potencial de metabolismo destes compostos é pela oxidação do substituinte hidroxila sobre este grupo. Estes compostos oxidados geralmente retêm alguma atividade inibidora de PI3K- α e $-\delta$.

[000103] Portanto, de acordo com um aspecto adicional da invenção, é fornecido um composto de Fórmula (A):



(A)

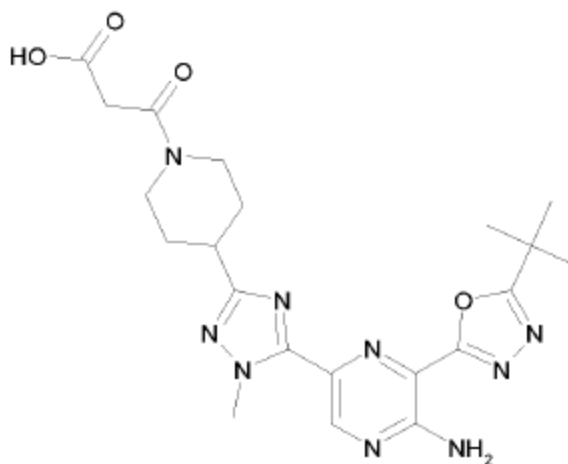
[000104] em que:

R^{1A} é metila ou etila; e

R_{2A} é (C1-2) alquila substituída por carboxila;

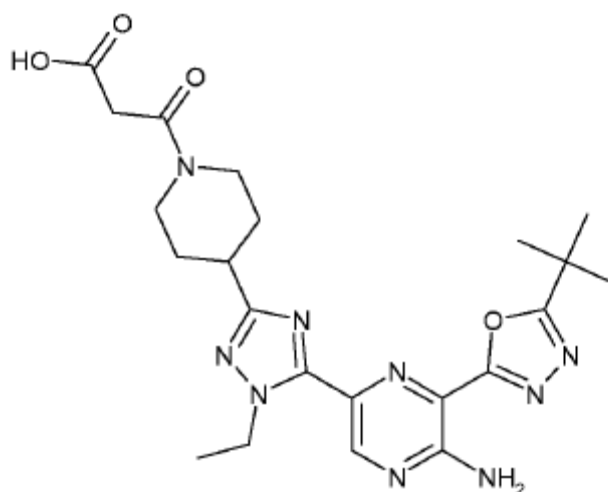
[000105] ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[000106] Exemplos de compostos de Fórmula (A) incluem o Exemplo 8, o qual é um metabolito identificado do Exemplo 1:



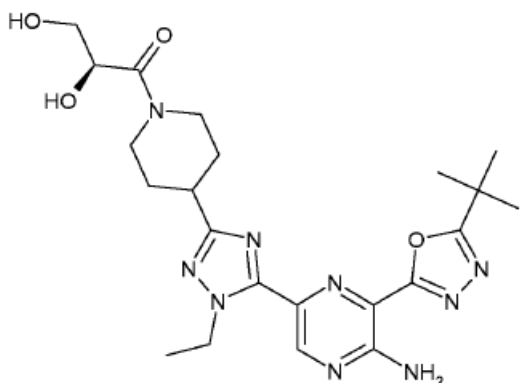
Exemplo 8

[000107] e o Exemplo 9, o qual é um metabolito identificado do Exemplo 3:

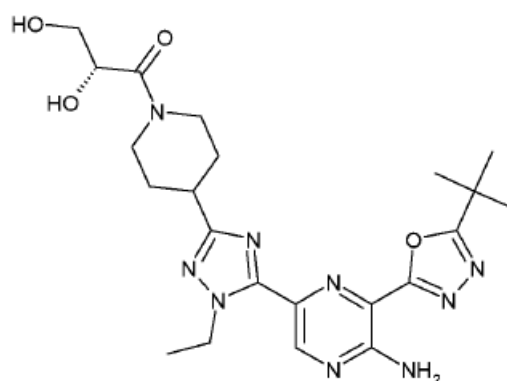


Exemplo 9

[000108] Outros metabólitos potenciais do Exemplo 3 são dois produtos de oxidação alternativos, mostrados abaixo e descritos nos Exemplos 10 e 11:



Exemplo 10



Exemplo 11

[000109] Sais farmacologicamente aceitáveis adequados de compostos de Fórmula (A) incluem, por exemplo, um sal de metal alcalino ou alcalino terroso, tal como um sal de cálcio ou magnésio ou um sal de amônio, ou um sal com uma base orgânica, tal como metilamina, dimetilamina, trimetilamina, piperidina, morfolina ou tris-(2-hidroxietil) amina.

[000110] Para evitar qualquer dúvida, deverá ser entendido que onde, no presente relatório descritivo, um grupo é qualificado por "aqui antes definido" ou "definido aqui antes", o dito grupo abrange a primei-

ra e mais ampla definição que ocorre, bem como cada uma e todas as definições particulares para este grupo.

[000111] Novos compostos particulares da invenção incluem, por exemplo, os compostos de Fórmula (I) ou sais farmacologicamente aceitáveis dos mesmos, em que, a menos que de outra forma afirmado, cada um de R^1 e R^2 tem qualquer um dos significados definidos aqui antes ou as afirmativas a seguir:

R^1 é metila.

R^1 é etila.

R^2 é qualquer um dos grupos (i) a (xi) conforme definido aqui antes.

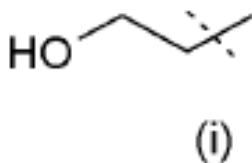
R^2 é os grupos (i) a (vi) conforme definido aqui antes.

R^2 é o grupo (i).

[000112] Um grupo particular de compostos da invenção são compostos de Fórmula (I) acima em que:

R^1 é metila ou etila,

R^2 é um grupo (i):



[000113] ou um sal farmacologicamente aceitável dos mesmos.

[000114] Compostos particulares da invenção são, por exemplo, os compostos de Fórmula (I) que são descritos nos exemplos que são indicados a seguir.

[000115] Por exemplo, um composto particular da invenção é um composto de Fórmula (I) selecionado de qualquer um dos seguintes:

1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona (Exemplos 1 e 2);

[000116] 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona (Exemplo 3);

(3R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-butan-1-ona (Exemplo 4);

(3S)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-butan-1-ona (Exemplo 5);

(2R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-2-metil-propan-1-ona

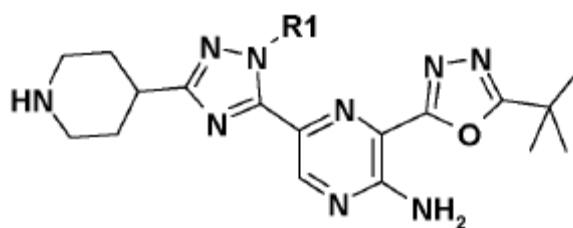
(Exemplo 6);

1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2-hidróxi-2-metil-propan-1-ona (Exemplo 7).

[000117] Outro aspecto da presente invenção fornece um processo para preparo de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo. Um processo adequado é ilustrado pelas variantes de processo representativas a seguir nas quais, salvo indicação em contrário, R¹, R² têm qualquer um dos significados aqui antes definido. Os materiais de iniciação necessários podem ser obtidos por meio de procedimentos atuais de química orgânica. O preparo de tais materiais de iniciação é descrito em conjunto com as variantes de processo representativas a seguir e dentro dos Exemplos associados. Alternativamente, materiais de iniciação necessários são obtidos por meio de procedimentos análogos àqueles ilustrados os quais estão dentro da competência normal de um químico orgânico.

[000118] Variantes de processo adequadas incluem, por exemplo, as seguintes:

[000119] reação, convenientemente na presença de um reagente de ativação adequado, de um composto de Fórmula II:



II

[000120] em que R^1 tem qualquer dos significados aqui antes definido, com o ácido carboxílico R^2 -COOH, exceto que qualquer grupo funcional é protegido se necessário, na presença de uma base adequada, após o que qualquer grupo de proteção que esteja presente é removido. Agentes de acoplamento adequados para esta reação incluem, por exemplo, hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio, TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisourônio) ou cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodiimida na presença de *N*-óxido de 2-hidróxi-piridina.

[000121] A reação é, convenientemente, realizada na presença de uma base adequada. Uma base adequada é, por exemplo, uma base de amina orgânica tal como, por exemplo, piridina, 2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, *N*-metilmorfolina, diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, di-isopropiletilamina, ou, por exemplo, um carbonato ou hidróxido de metal alcalino ou alcalino terroso, por exemplo, carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de cálcio, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio; de preferência, *N*-etil-*N,N*-diisopropilamina.

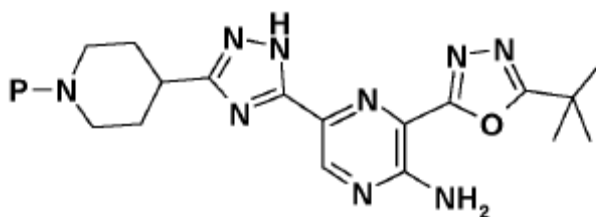
[000122] A reação é, convenientemente, realizada na presença de um solvente inerte adequado tal como, por exemplo, acetonitrila, *N,N*-dimetilformamida, *N*-metilpirrolidona, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benzeno, tolueno, xileno, metanol, etanol, solventes halogenados, tais como diclorometano, clorofórmio ou tetracloreto de

carbono, e em uma temperatura na faixa, por exemplo, de -50°C a 100°C, de preferência na faixa de 0°C a 30°C.

[000123] Alternativamente, o ácido carboxílico R²-COOH pode ser transformado em uma espécie ativada a qual pode, então, ser reagida com um composto de Fórmula II sob condições bem conhecidas na técnica.

[000124] Um grupo de proteção adequado para o grupo hidroxila é o grupo de proteção tetra-hidropirano, conforme descrito nos Exemplos 2 e 3. Condições adequadas para remoção deste grupo incluem condições ácidas suaves na presença de um álcool como solvente em uma temperatura entre 20 a 70°C, tal como metanol ou etanol. Um ácido suave típico usado é p-toluenossulfonato de piridina.

[000125] Um composto de Fórmula II pode ser obtido a partir da reação do composto de Fórmula III:



III

[000126] onde P é um grupo de proteção, tal como terc-butoxicarbonila,

[000127] com um composto de Fórmula R¹-L, em que L é um grupo de partida adequado tal como, por exemplo, um grupo halogênio, tal como um grupo bromo, iodo (convenientemente iodo), na presença de uma base adequada, após o que qualquer grupo de proteção que esteja presente é removido.

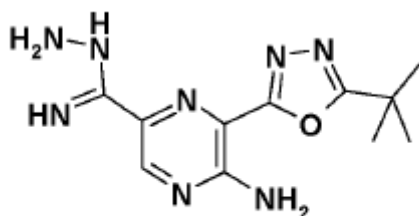
[000128] Uma base adequada é, por exemplo, uma base de amina orgânica, tal como 1,8-diazabicyclo[5.4.0] undec-7-eno.

[000129] A reação é, convenientemente, realizada na presença de um solvente inerte adequado tal como, por exemplo, 2-metiltetra-

hidrofurano, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxi etano, benzeno, tolueno, xileno, e em uma temperatura na faixa, por exemplo, de -50°C a 60°C, de preferência na faixa de -10°C a 0°C .

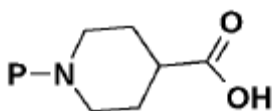
[000130] Condições adequadas para desproteção da terc-butoxicarbonila incluem condições ácidas, tal como ácido trifluoroacético em um solvente inerte, tal como diclorometano, aproximadamente na temperatura ambiente (20-25°C).

[000131] O composto III pode ser obtido a partir de uma reação de acoplamento, na presença de um reagente de ativação adequado, do composto de Fórmula IV:



IV

[000132] com um composto de Fórmula V:



V

[000133] de preferência na presença de uma base adequada, seguido por uma reação de ciclização na presença de um ácido suave.

[000134] A reação de acoplamento pode ser realizada na presença de um agente de acoplamento adequado tal como, por exemplo, hexafluorofosfato de *O*-(7-azabenzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametilurônio ou TBTU (tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisourônio).

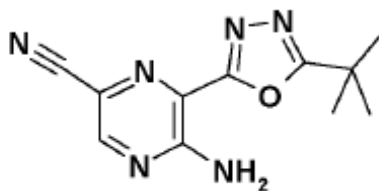
[000135] A reação de acoplamento é, convenientemente, realizada na presença de uma base adequada. Uma base adequada é, por exemplo, uma base de amina orgânica tal como, por exemplo, piridina,

2,6-lutidina, colidina, 4-dimetilaminopiridina, trietilamina, N-metilmorfolina, diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno, di-isopropiletilamina ou, por exemplo, um carbonato ou hidróxido de metal alcalino ou alcalino terroso, por exemplo, carbonato de sódio, carbonato de potássio, carbonato de cálcio, hidróxido de sódio ou hidróxido de potássio; de preferência N-etil-N,N-di-isopropilamina.

[000136] A reação de acoplamento é, convenientemente, realizada na presença de um solvente inerte adequado tal como, por exemplo, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxi etano, benzeno, tolueno, xileno, metanol, etanol, solventes halogenados, tais como diclorometano, clorofórmio ou tetracloreto de carbono, e em uma temperatura na faixa, por exemplo, de -50°C a 100°C, de preferência na faixa de 0°C a 30°C.

[000137] As condições de ciclização são realizadas na presença de um ácido suave, tipicamente ácido acético. A reação é, convenientemente, realizada na presença de um solvente inerte adequado tal como, por exemplo, N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, N-metilpirrolidona, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxi etano, benzeno, tolueno, xileno, em uma temperatura na faixa, por exemplo, de 50°C a 150°C, de preferência na faixa de 80°C a 100°C.

[000138] O composto IV pode ser obtido a partir de uma reação do composto de Fórmula VI com hidrazina.

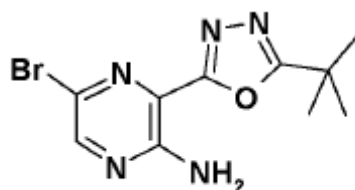


VI

[000139] Esta reação é, convenientemente, realizada na presença de um solvente inerte adequado tal como, por exemplo, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxi etano, benzeno, tolueno, xileno, ou um álco-

ol, tal como etanol ou isopropanol, em uma temperatura na faixa, por exemplo, de 20°C a 70°C, de preferência cerca de 50 °C.

[000140] O composto VI pode ser obtido a partir de uma reação catalisada por um metal do composto de Fórmula VII com uma fonte de cianeto, tal dicianeto de zinco (II).



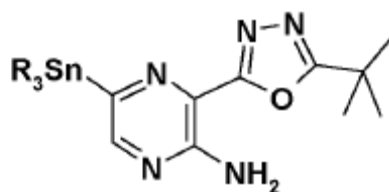
VII

[000141] Um catalisador adequado para a reação inclui, por exemplo, um catalisador de metal, tal como paládio (0), por exemplo, tetraquis(trifenilfosfina) paládio (0); ou um catalisador formado *in situ* a partir de um sal de paládio (II), por exemplo, acetato de paládio (II) cloreto de paládio (II), brometo de paládio (II), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio (II), cloreto de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaládio (II) ou tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio, e um ligante de fosfina, por exemplo, díciclo-hexil-(2',4',6'-tri-isopropilbifenil-2-il)fosfina. A reação é, convenientemente, realizada em um solvente adequado, tal como N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetóxi etano, benzeno, tolueno ou xileno, e em uma temperatura na faixa, por exemplo, de 20°C a 150°C, de preferência na faixa de 60°C a 120°C. A reação é também, convenientemente, realizada na presença de metal adicional, tal como zinco.

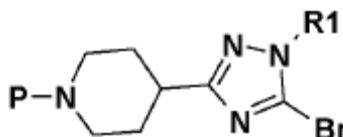
[000142] Reações adequadas deste tipo são descritas em "Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions", Segunda Edição, Editado por Armin Meijere, Francois Diederich, Wiley-VCH, 2004).

[000143] Sínteses do Composto VII foram descritas nos Exemplos 1 e 2.

[000144] Alternativamente, um composto de Fórmula II pode ser obtido por meio de reação catalisada por metal do composto VIII onde R é um alquila pequena, e o composto IX, onde P é um grupo de proteção, tal como terc-butoxicarbonila:



VIII



IX

[000145] Um catalisador adequado para a reação inclui, por exemplo, um catalisador de metal, tal como paládio (0), por exemplo, tetraquis(trifenilfosfina) paládio (0); ou um catalisador formado *in situ* a partir de um sal de paládio (II), por exemplo, acetato de paládio (II) cloreto de paládio (II), brometo de paládio (II), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio (II), cloreto de [1,1'-bis(difenilfosfino)ferroceno]dicloropaládio (II) ou tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio, e um ligante de fosfina, por exemplo, diciclo-hexil-(2',4',6'-tri-isopropilbifenil-2-il)fosfina.

[000146] A reação é, convenientemente, realizada em um solvente adequado, tal como N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benzeno, tolueno ou xileno, ou um álcool, tal como 4-metil-2-pentanol, em uma temperatura na faixa, por exemplo, de 50°C a 180°C, de preferência na faixa de 120°C a 150°C.

[000147] A reação é também, convenientemente, realizada na presença de sal adicional, tal como cloreto de lítio.

[000148] Reações adequadas deste tipo são descritas em "Metal-Catalyzed Cross-Coupling Reactions", Segunda Edição, Editado por Armin Meijere, Francois Diederich, Wiley-VCH, 2004).

[000149] Um composto de Fórmula VIII pode ser obtido a partir da reação catalisada por metal de composto VII com um diestano de hexa-alkila adequado. Um catalisador adequado para a reação inclui, por exemplo, um catalisador de metal, tal como paládio (0), por exemplo tetraquis(trifenilfosfina) paládio (0); ou um catalisador formado *in situ* a partir de um catalisador de sal de paládio (II), por exemplo, acetato de paládio (II), cloreto de paládio (II), brometo de paládio (II), cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio (II), cloreto de [1,1'-bis(difenilfosfina)ferroceno]dicloropaládio (II) ou tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio, e um ligante de fosfina, por exemplo, diciclo-hexil(2',4',6'-tri-2-il)fosfina. A reação é, convenientemente, realizada em um solvente adequado, tal como N,N-dimetilacetamida, N,N-dimetilformamida, tetra-hidrofurano, 1,4-dioxano, 1,2-dimetoxietano, benzeno, tolueno, xileno ou um álcool, tal como 4-metil-2-pentanol, em uma temperatura na faixa, por exemplo, de 50°C a 100°C, de preferência na faixa de 70°C a 80°C.

[000150] O composto de Fórmula IX pode ser obtido a partir de material comercialmente disponível em algumas etapas, conforme ilustrado no Exemplo 1 (com R¹ = Me e P = terc-butoxicarbonila).

[000151] Deverá ser entendido que outras permutas das etapas de processo nas variantes de processo descritas acima também são possíveis.

[000152] Deverá ser entendido que qualquer composto de Fórmula (I) obtido através de qualquer um dos processos descritos aqui antes podem ser convertidos em outro composto de Fórmula (I), se necessário.

[000153] Quando um sal farmacologicamente aceitável de um com-

posto de Fórmula (I) é requerido, por exemplo, um sal de adição de ácido, ele pode ser obtido, por exemplo, por meio de reação do dito composto com um ácido adequado.

[000154] Quando um profármaco farmacologicamente aceitável de um composto de Fórmula (I) é requerido, ele pode ser obtido usando um procedimento convencional. Por exemplo, um éster clivável *in vivo* de um composto de Fórmula (I) pode ser obtido, por exemplo, por meio de reação de um composto de Fórmula (I) contendo um grupo hidróxi com um ácido carboxílico farmacologicamente aceitável. Mais informações sobre profármacos foram fornecidas anteriormente.

[000155] Também será apreciado que, em algumas das reações mencionadas aqui antes, pode ser necessário ou desejável proteger quaisquer grupos sensíveis nos compostos. Os casos onde proteção é necessária ou desejável, e métodos adequados para proteção, são conhecidos por aqueles versados na técnica. Grupos de proteção convencionais podem ser usados de acordo com a prática convencional (para ilustração vide T.W. Green, *Protective Groups in Organic Synthesis*, John Wiley and Sons, 1991). Assim, se os reagentes incluem grupos, tais como amino, carbóxi ou hidróxi, pode ser desejável proteger o grupo em algumas das reações mencionadas aqui.

[000156] Um grupo de proteção adequado para um grupo amino ou alquilamino é, por exemplo, um grupo acila, por exemplo, um grupo alcanoíla, tal como acetila, um grupo alcoxicarbonila, por exemplo, um grupo metoxicarbonila, etoxicarbonila ou/grupo butoxicarbonila, um grupo arilmetoxicarbonila, por exemplo, benziloxicarbonila, ou um grupo aroíla, por exemplo, benzoíla. As condições de desproteção para os grupos de proteção acima variam necessariamente com a escolha do grupo de proteção. Assim, por exemplo, um grupo acila, tal como um grupo alcanoíla ou alcoxicarbonila, ou um grupo aroíla pode ser removido, por exemplo, por meio de hidrólise com uma base adequada, tal

como um hidróxido de metal alcalino, por exemplo, hidróxido de lítio ou sódio. Alternativamente, um grupo acila, tal como um grupo t-butoxicarbonila, pode ser removido, por exemplo, por meio de tratamento com um ácido adequado, tal como ácido clorídrico, ácido sulfúrico ou ácido fosfórico ou ácido trifluoroacético, e um grupo arilmetoxicarbonila, tal como um grupo benziloxicarbonila, pode ser removido, por exemplo, por meio de hidrogenação sobre um catalisador, tal como paládio-sobre-carbono, ou através de tratamento com um ácido de Lewis, por exemplo, tris(trifluoroacetato) de boro. Um grupo de proteção alternativo adequado para um grupo amino primário é, por exemplo, um grupo ftaloíla, o qual pode ser removido por meio de tratamento com uma alquilamina, por exemplo, dimetilaminopropilamina, ou com hidrazina.

[000157] Um grupo de proteção adequado para um grupo hidróxi é, por exemplo, um grupo acila, por exemplo, um grupo alcanóila, tal como acetila, um grupo aroíla, por exemplo, benzoíla, ou um grupo arilmetila, por exemplo, benzila. As condições de desproteção para os grupos de proteção acima variarão necessariamente com a escolha do grupo de proteção. Assim, por exemplo, um grupo acila, tal como um grupo alcanóila ou um grupo aroíla, pode ser removido, por exemplo, por meio de hidrólise com uma base adequada, tal como um hidróxido de metal alcalino, por exemplo, hidróxido de lítio ou sódio. Alternativamente, um grupo arilmetila, tal como um grupo benzila, pode ser removido, por exemplo, através de hidrogenação sobre um catalisador, tal como paládio-sobre-carbono.

[000158] Um grupo de proteção adequado para um grupo carboxila é, por exemplo, um grupo de esterificação, por exemplo, um grupo metila ou um grupo etila, o qual pode ser removido, por exemplo, por meio de hidrólise com uma base, tal como hidróxido de sódio ou, por exemplo, um grupo t-butila, o qual pode ser removido, por exemplo,

através de tratamento com um ácido, por exemplo, um ácido orgânico, tal como ácido trifluoroacético ou, por exemplo, um grupo benzila, o qual pode ser removido, por exemplo, por meio de hidrogenação sobre um catalisador, tal como paládio-sobre-carbono.

[000159] Os grupos de proteção podem ser removidos em qualquer etapa conveniente na síntese usando métodos convencionais bem conhecidos na técnica química.

[000160] Alguns dos intermediários (por exemplo, os compostos de Fórmulas II, III, IV, VI, VII, VIII) definidos aqui são novos e estes são fornecidos como uma característica adicional da invenção.

Ensaio Biológicos

[000161] Os ensaios a seguir foram usados para medir os efeitos dos compostos da presente invenção como a) inibidores das enzimas quinases PI3 em ensaios bioquímicos, como b) inibidores de outras quinases em ensaios bioquímicos, c) como inibidores *in vitro* de fosfo AKT (Thr308) em células BT474, d) como inibidores *in vitro* de fosfo AKT (Ser473) em células MDA-MB-468, e) como inibidores *in vitro* de fosfo AKT (Ser473) em células Jeko, f) como inibidores *in vitro* de fosfo Chk1 (Ser345) em células HT29, g) como inibidores da proliferação celular através de um painel de linhagens de células tumorais, h & i) como inibidores *in vivo* de fosfo AKT (Ser473) ou inibidores *in vivo* de crescimento de tumor, respectivamente, em camundongos SCID transplantados com a linhagem de células de adenocarcinoma de mama humano, MCF7.

[000162] Abreviaturas usadas nos protocolos de ensaio:

PIP2: PI(4,5)P2, 4,5-bisfosfato de fosfatidilinositol

s.c: subcutânea

ATP: trifosfato de adenosina

DMSO: sulfóxido de dimetila

TRIS: tris(hidroximetil)aminometano

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamônio]-1-propanossulfonato

TDT: Ditiotreitól

FBS: Soro fetal bovino

DMEM: Meio de Eagle Modificado por Dulbecco

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

EGTA: ácido etileno glicol tetracético

BSA: albumina sérica bovina

PBS: solução salina tamponada com fosfato

HRP: Peroxidase de rábano

RPMI: Meio 1640 do Roswell Park Memorial Institute

4NQO: N-óxido de 4-nitroquinolina

EMEM: meio essencial mínimo de Eagle

CO₂: dióxido de carbono

PBST: solução salina tamponada com fosfato/Tween

Ab: anticorpo

Reagente MTS: [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio, sal interno; MTS] e um reagente de acoplamento de elétrons (metossulfato de fenazina) PMS.

Ensaio de inibição enzimática in vitro

[000163] A inibição de PI3K- β , PI3K- α , PI3K- γ e PI3K- δ foi avaliada em um ensaio de atividade enzimática com base em Kinase Glo usando enzimas recombinantes humanas. A plataforma de ensaio mediu indiretamente a depleção de ATP após incubação com enzima, substrato PIP₂, ATP e composto.

[000164] Após término da reação enzimática, o ATP restante foi usado em uma reação enzimática secundária, onde luciferase converteu luciferina de besouro em oxiluciferina sob a emissão de luz. Existia uma relação direta entre a luminescência medida e o ATP restante em uma reação de quinase terminada. Portanto, a luminescência foi inversamente relacionada à atividade de quinase. Tipicamente, doze dife-

rentes concentrações de composto foram testadas e os dados brutos a partir da inibição de PI3K- β , PI3K- α , PI3K- γ ou PI3K- δ foram representados graficamente em função da concentração de inibidor.

Detalhes do Método

[000165] Os compostos em DMSO a 100% foram adicionados a placas de ensaio por meio de distribuição acústica. Enzima PI3K foi adicionada em um tampão de Tris (Tris a 50 mM, pH de 7,4, CHAPS a 0,05%, DTT a 1 mM e cloreto de magnésio a 10 mM) e deixada pré-incubar com o composto durante 5 minutos antes da adição de solução de substrato contendo PIP2 e ATP. A reação enzimática foi interrompida após 80 minutos por meio da adição de solução de detecção Kinase Glo contendo Luciferrina e luciferase (do kit Kinase Glo(R) Plus Luminescent Kinase Assay (Promega #V3772)). As placas foram deixadas durante 30 minutos em temperatura ambiente, então, lidas um Instrumento Pherastar com um bloco de filtro de luminescência convencional. A concentração final de DMSO, ATP e PIP2 no ensaio foi de 1%, 8 μ M e 80 μ M, respectivamente.

Análise de Dados

[000166] Os valores de IC₅₀ foram calculados usando uma curva log de ajuste para um ajuste de regressão não linear. O valor de IC₅₀ era a concentração de composto de teste que inibiu 50% da atividade enzimática.

(b) Avaliação de seletividade de quinase, além de enzimas quinase PDK de classe 1

[000167] Grandes painéis de ensaios de quinase são oferecidos por uma variedade de fornecedores comerciais, tais como Millipore, Invitrogen e ProQinase. Tais painéis permitem uma avaliação da seletividade global de quinase de um determinado composto. Os métodos/tecnologias precisos variarão, dependendo do fornecedor.

[000168] Dados de seletividade para alguns dos compostos descritos

aqui foram gerados usando ensaios enzimáticos realizados no MRC - Division de Signal Transduction Therapy (DSTT), MRC Protein Phosphorylation Unit, Dundee, Reino Unido. Os ensaios de proteína quinase foram realizados usando um formato radioquímico. Os ensaios foram realizados em placas Multidrop com 384 cavidades em temperatura ambiente em um volume total de ensaio de 25,5 μ l. Os compostos foram pré-incubados na presença da enzima e o substrato peptídico/proteína durante 5 minutos antes do início da reação mediante adição de 10 μ l de ATP (concentração final selecionada para cada quinase em 5, 20 ou 50 μ M). Os ensaios foram realizados em temperatura ambiente antes de extinção mediante adição de ácido fosfórico a 5 μ l. Os conteúdos da placa de ensaio foram, então, coletados sobre placas Whatman-P81-Unifilter por um Packard Harvester (tampão de lavagem era ácido ortofosfórico a 50 mM) e secos ao ar. As placas Unifilter secas foram, então, seladas quando da adição de MicroScint O e foram contadas em contadores de cintilação Packard Topcount NXT. Este protocolo captura o formato genérico adequado para a maioria das quinases no painel, mas modificações nos protocolos foram necessárias para um pequeno número de quinases, conforme será familiar para aqueles versados na técnica.

[000169] Os ensaios de quinase lipídica para ~18 quinases lipídicas também foram realizados em DSTT. Todos os ensaios de quinase lipídica foram realizados em placas com 384 cavidades em temperatura ambiente em um volume total de ensaio de 40 μ l. O ensaio foi realizado de acordo com os protocolos fornecidos com o ensaio ADP-GLO (Promega, #V9101). Este protocolo captura o formato genérico adequado para a maioria das quinases no painel, mas modificações nos protocolos foram necessárias para um pequeno número de quinases, conforme será familiar para aqueles versados na técnica.

[000170] A seletividade de quinase também foi avaliada usando a

plataforma de rastreio KINOMEscan™ disponível da DiscoverX. Esta emprega um ensaio de ligação competitiva sítio-dirigida ativo para medir quantitativamente as interações entre os compostos de teste e mais de 450 quinases humanas e das variantes mutantes relevantes para doenças. Os ensaios KINOMEscan™ não requerem ATP e, deste modo, reportam afinidades de interação termodinâmica verdadeiras, em oposição aos valores de IC₅₀, o qual pode depender da concentração de ATP. A metodologia se baseia em compostos que se ligam ao sítio ativo da quinase e impedem, direta (estericamente) ou indiretamente (alostericamente), a quinase de se ligar ao ligante imobilizado, deste modo, reduzindo a quantidade de quinase capturada em um suporte sólido. Por outro lado, moléculas de teste que não se ligam à quinase não têm efeito sobre a quantidade de quinase capturada sobre um suporte sólido. "Hits" de rastreio são identificados medindo-se a quantidade de quinase capturada em teste versus amostras de controle usando um método de qPCR quantitativa que detecta o marcador de DNA associado. De uma maneira similar, as constantes de dissociação (K_ds) para as interações de composto de teste-quinase são calculadas medindo-se a quantidade de quinase capturada sobre o suporte sólido como uma função da concentração de composto de teste.

(c) Protocolo para ensaio que mede AKT (Tyr308) fosforilado em células BT474

[000171] Este ensaio foi usado para medir a inibição de PI3K- α em células. Células BT474 (carcinoma ductal de mama humano, ATCC HTB-20) foram cultivadas em placas pretas com 384 cavidades (Costar, #3712) em uma densidade de 5600 células/cavidade em DMEM contendo FBS a 10% e glutamina a 1% e deixadas aderir durante a noite.

[000172] Na manhã seguinte, compostos em DMSO a 100% foram adicionados às placas de ensaio por meio de distribuição acústica. Após uma incubação de duas horas a 37°C e 5% de CO₂, o meio foi aspirado

e as células foram submetidas à lise com um tampão contendo Tris a 25 mM, EDTA a 3 mM, EGTA a 3 mM, fluoreto de sódio a 50 mM, ortovanadato de sódio a 2 mM, sacarose a 0,27M, β -glicerofosfato a 10 mM, pirofosfato de sódio a 5 mM, Triton X-100 a 0,5% e comprimidos de coquetel de inibidores de protease completo (Roche #04 693 116 001, usado 1 comprimido por 50 ml de tampão de lise).

[000173] Após 20 minutos, os lisatos celulares foram transferidos para placas de ELISA (Greiner # 781077) as quais tinham sido pré-revestidas com um anticorpo anti-AKT total em tampão de PBS e a ligação não específica foi bloqueada com BSA a 1% em PBS contendo Tween 20 a 0,05%. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as placas foram lavadas com tampão de PBS contendo Tween 20 a 0,05% e foram ainda incubadas com um anticorpo monoclonal antifosfo AKT de camundongo T308 durante duas horas. As placas foram novamente lavadas conforme acima antes da adição de um anticorpo secundário conjugado de cavalo anti-HRP de camundongo. Após uma incubação de duas horas em temperatura ambiente, as placas foram lavadas e solução de substrato de trabalho QuantaBlu (Thermo Scientific #15169, preparada de acordo com as instruções do fornecedor) foi adicionada a cada cavidade. O produto fluorescente revelado foi interrompido após 60 minutos mediante adição de solução de interrupção às cavidades. As placas foram lidas usando um leitor de placas Tecan Safire usando excitação a 325 nm e comprimentos de onda de emissão a 420 nm, respectivamente. Exceto quando especificado, os reagentes contidos no kit ELISA em sanduiche Path Scan Phospho AKT (Thr308) da Cell Signalling (#7144) foram usados neste ensaio ELISA.

(d) Protocolo para detecção de fosfo AKT (Ser473) em células MDA-MB-468 como uma medida para inibição de quinase PDK-beta

[000174] Este ensaio foi usado para medir a inibição de PI3K- β em

células e foi usado, em conjunto com o ensaio (c) acima, para determinar a seletividade alfa versus beta em células. Células MDA-MB-468 (adenocarcinoma de mama humano #ATCC HTB 132) foram cultivadas a 1500 células/cavidade em 40 µl de DMEM contendo FBS a 10% e glutamina a 1% em placas Greiner com 384 cavidades de fundo chato pretas. As placas com células foram incubadas durante 18 horas em uma incubadora a 37°C antes de dosagem com compostos em DMSO a 100% usando distribuição acústica.

[000175] Os compostos foram dosados em uma faixa de concentrações de 12 pontos em um mapa de placa randomizado. As cavidades de controle foram geradas por meio de dosagem de DMSO a 100% (sinal máximo) ou adição de um composto de referência (um inibidor de PI3K-β) que eliminou completamente o sinal de pAKT (controle mínimo). As placas foram incubadas a 37°C durante duas horas, as células foram, então, fixadas mediante adição de 10 µl de uma solução de formaldeído a 3,7%. Após 30 minutos, as placas foram lavadas com PBS usando um lavador de placas Tecan PW384. As cavidades foram bloqueadas e células permeabilizadas com a adição de 40 µl de PBS contendo Tween 20 a 0,5% e Marvel™ a 1% (leite em pó seco) e incubadas durante 60 minutos em temperatura ambiente. As placas foram lavadas com PBS contendo Tween 20 a 0,5% (v/v) e 20 µl de anticorpo antifosfo AKT Ser473 de coelho (Cell Signaling Technologies, #3787) no mesmo PBS-Tween + Marvel™ a 1% adicionados e incubadas durante a noite a 4°C.

[000176] As placas foram lavadas 3 vezes com PBS + Tween 20 a 0,05% usando um Tecan PW384. 20 µl de anticorpo secundário anti-coelho Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, #A11008) diluído em PBS + Tween 20 a 0,05% contendo Marvel™ a 1% foram adicionados a cada cavidade e incubados durante 1 hora em temperatura ambiente. As placas foram lavadas três vezes conforme antes, então, 20 µl de PBS

foram adicionados a cada cavidade e as placas seladas com um selante de placas preto.

[000177] As placas foram lidas em um leitor de placas Acumen o mais rapidamente possível, medindo a fluorescência verde após excitação com laser a 488 nm. Usando este sistema, valores de IC₅₀ foram gerados e a qualidade das placas foi determinada através de cavidades de controle. Compostos de referência foram executados cada vez para monitorar o desempenho do ensaio.

(e) Protocolo para detecção de fosfo AKT (Ser473) em células Jeko

[000178] Este ensaio foi usado para medir a inibição de PI3K- δ em células. Os compostos em uma concentração final de 10X em 10 μ l de DMSO a 1% (v/v) foram adicionados às cavidades de uma placa com 96 cavidades Greiner de fundo em V (Sigma #M9686). Os compostos foram dosados em uma faixa de concentrações de 10 pontos a partir da dose máxima de 1 μ M ou 10 μ M, 8 compostos foram dosados em uma placa. Havia oito cavidades de controle de sinal máximo por placa dosada com anticorpo anti-IgM (AffiniPure F(ab')₂ Fragment Goat Anti-Human IgM (Stratech, #109-006-129)) e veículo e 8 cavidades de controle de sinal mínimo dosadas com anticorpo anti-IgM e um inibidor de PI3K- δ de referência. A concentração final de veículo foi DMSO a 0,01%. Uma curva de dose-resposta completa para um composto seletivo para PI3K- δ foi incluída em cada operação. Células Jeko B (linfoma de células do manto humano, ATCC #CRL-3006) foram cultivadas em placas Greiner com 96 cavidades de fundo em V contendo compostos. As células foram cultivadas a 100.000 células/cavidade em 70 μ l de RPMI contendo glutamina a 1%.

[000179] As placas com células foram incubadas com composto durante 1 hora em uma incubadora a 37°C. Após este tempo de pré-incubação com composto, o anticorpo anti-IgM descrito acima foi adicionado às placas em uma concentração final de X5 em 20 μ l de tam-

pão de ensaio (meio RPMI contendo glutamina a 1%). A concentração final de anti-IgM foi de 0,06 µg/ml ou uma dose EC₉₀ equivalente. As placas foram incubadas a 37°C durante 10 min, então, as placas foram imediatamente colocadas em gelo e centrifugadas a 12000 rpm durante 4 min. Sobre gelo, os sobrenadantes foram cuidadosamente removidos com uma pipeta manual e 40 µl de tampão de lise adicionados. As placas foram incubadas sobre gelo durante 5 min e armazenadas a -80°C até serem ensaiadas no kit Phosphor (Ser473)/total Aki Whole Cell Lysate de acordo com as instruções do fabricante (Mesoscale Diagnostics, #K11100D-3).

(f) Protocolo para detecção de fosfo Chk1 (Ser 345) em células HT29

[000180] ATR (quinase relacionada à Telangiectasia por Ataxia + Rad3) é uma quinase relacionada à quinase PI3 a qual fosforila múltiplos substratos de serina ou treonina em resposta a danos ao DNA ou bloqueio de replicação. Chk1, uma proteína quinase a jusante de ATR, desempenha um papel chave no controle de *checkpoint* de dano ao DNA. A ativação de Chk1 envolve a fosforilação de Ser317 e Ser345 (a última considerada como o alvo preferencial para fosforilação/ativação por ATR).

[000181] Este é um ensaio com base em células para medir a inibição de quinase ATR ao medir uma diminuição na fosforilação de Chk1 (Ser 345) em células HT29 após tratamento com composto e o mimético de UV 4NQO (Sigma #N8141). Células HT29 (ECACC #85061109) foram cultivadas em placas de ensaio com 384 cavidades (Costar #3712) em uma densidade de 6000 células/cavidade em 40 µl de meio EMEM contendo L-glutamina a 1% e FBS a 10% e deixadas aderir durante a noite. Na manhã seguinte, compostos em DMSO a 100% foram adicionados às placas de ensaio por meio de distribuição acústica. Após uma hora de incubação a 37°C e 5% de CO₂, 40 µl de 4NQO a 3 mM em DMSO a 100% foram adicionados a todas as cavi-

dades por meio de distribuição acústica, exceto quanto às cavidades de controle de sinal mínimo, as quais foram deixadas sem tratamento com 4NQO para gerar um controle de resposta nula. As placas foram reveladas na incubadora durante mais 1 hora. Então, as células foram fixadas mediante adição de 20 µl de formaldeído a 3,7% em solução de PBS e incubadas durante 20 minutos em temperatura ambiente. Então, 20 µl de Triton X100 a 0,1% em PBS foram adicionados e incubados durante 10 minutos em temperatura ambiente para permeabilizar as células. Então, as placas foram lavadas uma vez com 50 µL/cavidade de PBS usando um lavador de placas Biotek EL405.

[000182] Anticorpo fosfo-Chk1 Ser 345 (Cell Signalling Technology #2348) foi diluído 150 vezes em PBS contendo polissorbato/Tween a 0,05% e 15 µl foram adicionados a cada cavidade e incubados durante a noite em temperatura ambiente. Na manhã seguinte, as placas foram lavadas três vezes com 50 µl/cavidade de PBS usando um lavador de placas Biotek EL405 e, então, 20 µl de solução de Ab secundário contendo anticorpo de cabra anti-IgG de coelho Alexa Fluor 488 diluído 500 vezes (Molecular Probes #A-11008) e 0,002 mg/ml de corante Hoechst (Molecular Probes #H-3570), em PBST, foram adicionados. Após duas horas de incubação em temperatura ambiente, as placas foram lavadas três vezes com 50 µl/cavidade de PBS usando um lavador de placas Biotek EL405 e as placas foram seladas com vedantes de placa preto até leitura. As placas foram lidas usando um instrumento ArrayScan VTI usando um filtro XF53 com objetiva de 10X. Um conjunto de dois lasers foi usado para analisar a coloração nuclear com Hoeschst (405 nm) e coloração de anticorpo secundário de pChk1 (488 nm).

(g) Ensaios de proliferação celular em linhagens de células tumorais (usados para demonstrar uma hipótese de medicina personalizada)

[000183] A sensibilidade de um painel de linhagens de células de

câncer humano aos efeitos dos compostos foi determinada em um ensaio de proliferação padrão. As linhagens de células foram adquiridas através do AstraZeneca Cell Bank. A maioria das linhagens de células também estão disponíveis através do Cell Bank Repositories conhecidos por aqueles que trabalham na técnica, por exemplo, ATCC, ECACC, DMSZ, RIKEN, KCLB, JCRB (HSRRB), LBNL, CLS e ICLC.

[000184] As células foram colocadas em placas com 96 cavidades em densidades de 1000-6000 células por cavidade em meio RPMI contendo FBS a 10%. Após incubação a 37°C durante 16 horas, várias concentrações de composto foram adicionadas às placas de ensaio. Após incubação durante mais 72 horas, as células viáveis foram determinadas por meio da adição de reagente MTS (Promega #3582) a cada cavidade durante duas horas. MTS é um sal de tetrazólio que é biorreduzido por células metabolicamente ativas na presença de um reagente de acoplamento de elétrons em formazano. O produto formazano foi, então, quantificado pela absorbância a 490 nm como um indicador do número relativo de células vivas. De modo a determinar a GI_{50} (concentração na qual o crescimento das células foi inibido em 50%), o número relativo de células presentes no momento de adição de fármaco foi determinado comparando-se com a leitura de MTS antes do fármaco ser adicionado e este valor foi subtraído do valor a 72 horas de células não tratadas como uma medida de crescimento celular durante o ensaio.

[000185] Análise destes dados, descrita abaixo em "Exemplos de Medicina Personalizada/Assistência Médica Personalizada", ilustra como estes dados podem ser analisados para revelar que inibidores de PDK α exibem inibição de crescimento seletiva das linhagens de células com mutação no gene de PIK3CA. Isto ilustra uma oportunidade de Assistência Médica Personalizada (**P**ersonalised **H**ealth**C**are - **PHC**) ou Medicina Personalizada onde uma leitura de biomarcador pa-

ra previsão de resposta poderia ser usada para identificar pacientes com tumores que contêm mutações no gene de PIK3CA e os quais, mais provavelmente, responderiam aos compostos descritos aqui.

[000186] Outros potenciais marcadores de resposta para os compostos descritos aqui incluem, porém sem limitações, um aumento no número de cópias, amplificação ou translocação do gene de PIK3CA e outras alterações genéticas, genômicas ou proteômicas as quais fornecem uma medida de ativação ou dependência da via de quinase PI33; por exemplo, porém sem limitações, ativação ou mutação de uma ou mais tirosina quinases receptoras ou translocação nos genes de PIK3R os quais codificam as subunidades reguladoras (p85) de quinases PI3 ou fosforilação de marcadores de sinalização a jusante, tais como pAKT, PS6 ou FOXO status. Além disso, análise de outros genes e/ou a sinalização de seus produtos de proteína, por exemplo, Kras, pode ajudar a melhorar a previsibilidade de uma abordagem de Medicina Personalizada.

(h) Protocolo para detecção de fosfo AKT (Ser473) a partir de tumores MCF-7 crescidos em camundongos SCID machos

[000187] Este foi um ensaio farmacodinâmico que fornece uma medida de inibição de PI3K- α em um modelo animal. Camundongos machos SCID (AZ Reino Unido, também disponíveis de Charles River, Reino Unido) foram transplantados subcutaneamente (s.c.) com a linhagem de células de adenocarcinoma de mama humano MCF7 (ICRF London, também disponível da ATCC #HTB-22)) para determinar a inibição de fosforilação de AKT com inibidores de quinases PI3. Os camundongos foram implantados com um 0,5 mg de pellets de estrogênio de 21 dias (Innovative Research of America, #E121) 24 horas antes de implantação das células. 5×10^6 células em Matrigel a 50% (BD Bioscience) foram injetadas no flanco esquerdo dos animais. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 8 controles e 4

tratamentos quando os tumores atingiram um volume de 400 mm³ e dosagem começou no dia seguinte. Os tumores foram removidos em pontos de tempo selecionados, quando amostras de sangue também foram coletadas para medições PK.

[000188] Os tumores excisados dos camundongos foram colocados em um tubo de preparo rápido (tubos com nervuras de 2 ml contendo matriz de lise A, MP Biomedicals #6910-500) e imediatamente congelados. 1 ml de tampão de lise (Tris a 25 mM, EDTA a 3 mM, EGTA a 3 mM, fluoreto de sódio a 50 mM, ortovanadato a 2 mM, sacarose a 0,27M, beta-glicerofosfato a 10 mM, pirofosfato de sódio a 5 mM, Triton X-100 a 0,5%) mais inibidores de fosfatase (Sigma #P2850 e Sigma # P5726, diluído a 1:100) e inibidores de protease (Sigma #P8340, diluído a 1:200) foram adicionados a cada tubo. Os tumores foram homogeneizados durante 1 minuto em um equipamento FastPrep-TM (MP Biomedicals #116004500) e, então, deixados sobre gelo durante 5 minutos, seguido por duas etapas adicionais de homogeneização, cada uma seguida por uma incubação de 5 minutos sobre gelo. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 13.000 rpm em uma centrífuga refrigerada. Os lisatos clarificados foram, então, colocados em tubos frescos e 10 µl usados para um ensaio de determinação de proteínas.

[000189] A detecção de AKT total e fosforilado (Ser473) foi realizada usando um kit de ensaio MSD Multi-spot (Meso Scale Discovery #K1510OD-3). Cada cavidade da placa continha 4 pontos; dois destes foram revestidos com anticorpos monoclonais de camundongo fornecidos com o kit; um foi revestido com um anticorpo de captura para AKT total e um foi revestido com um anticorpo para AKT fosforilado (Ser473). As placas foram bloqueadas durante a noite em uma câmara gelada em um agitador com 150 µl de solução de bloqueio por cavidade, a qual foi feita usando 20 ml de 1x solução de lavagem mais 600 mg de Bloquea-

dor A fornecidos com o kit. As placas foram lavadas três vezes com 0,3 ml por cavidade de solução de lavagem. Uma alíquota do lisato foi tirada de cada tumor e diluída para uma concentração de 2 mg/mL com tampão de lise, 25 µl de lisato diluído foram, então, adicionados a cada cavidade, proporcionando uma quantidade total de 50 µg por cavidade. As placas foram colocadas em um agitador em temperatura ambiente durante uma hora antes que as placas fossem lavadas três vezes. Uma solução do anticorpo de detecção foi preparada usando uma mistura de solução de bloqueio e solução de lavagem mais uma diluição de 1 para 50 de 50x anticorpo anti-AKT total SULFO-TAG-TM anticorpo. As placas foram colocadas em um agitador em temperatura ambiente durante uma hora antes que as placas fossem lavadas três vezes. 150 µl de tampão de leitura fornecido com o kit foram diluídos a 1:4 com água deionizada e adicionados a cada cavidade e, então, a placa foi lida no analisador de placas MSD. O tampão de leitura fornece o ambiente químico correto para eletroquimioluminescência de modo que, quando o leitor de placas aplica uma tensão à placa, os eletrodos sobre a base da placa fazem com que o marcador ligado ao anticorpo de detecção emita luz. A intensidade de luz emitida é uma medida quantitativa de AKT, total ou fosforilado, que está presente. Para calcular a proporção de AKT fosforilado para total, foi aplicado um cálculo conforme sugerido pela Meso Scale: duas vezes o sinal fosforilado dividido pelo sinal total mais fosforilado, então, multiplicado por 100, para fornecer o % de fosfoproteína. Os valores foram convertidos em Log 10 e, então, estes valores foram usados para calcular a MÉDIA GEOMÉTRICA para cada grupo mais o erro padrão. Um t-teste de Student foi, então, aplicado usando uma fórmula duplamente configurada cauda e variância desigual para verificar a significância. Estudos demonstraram que um grupo de controle de 8 animais com 4 por grupo de tratamento eram suficientes para realizar o estudo.

Protocolo para detecção de inibição de crescimento de tumor na linhagem de células de adenocarcinoma de mama humano MCF7 transplantadas em camundongos SCID

[000190] Este método permite avaliação da eficácia antitumor dos inibidores de quinases PI3 *in vivo* em um modelo dependente de PI3. Assim como para os estudos PD, indicados acima, camundongos SCID machos foram transplantados s.c. com a linhagem de células de adenocarcinoma de mama humano, MCF7. Os camundongos foram implantados com um 0,5 mg de pellets de estrogênio de 21 dias 24 horas antes de implantação das células. 5×10^6 células em Matrigel a 50% foram injetadas s.c. no flanco esquerdo dos animais. Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 10-15 quando os tumores atingiram um volume de $\sim 200-300 \text{ mm}^3$ e o tratamento iniciado. Os animais foram dosados durante 2-4 semanas por via peroral, intravenosa ou intraperitoneal com o composto em um veículo adequado para administração através da via necessária e coerente com os requisitos de bem-estar (suspensão para dosagem oral está na faixa de pH de 4-7, solução para dosagem ip/iv na faixa de pH de 5,5-7,0) e em doses definidas. Os tumores foram medidos geralmente duas vezes por semana com um calibrador e o volume de tumores calculados usando a fórmula elíptica ($\pi/6 \times \text{largura} \times \text{largura} \times \text{comprimento}$).

[000191] Embora as propriedades farmacológicas dos compostos de Fórmula (I) variem com a alteração estrutural conforme esperado, em geral, a atividade possuída pelos compostos da Fórmula (I) pode ser demonstrada nas concentrações ou doses a seguir em um ou mais dos ensaios (a) e (c) acima:

Teste (a): - IC_{50} contra PI3K- α na faixa, por exemplo, de 1 nM - 100 nM;

Teste (c): - IC_{50} contra fosfo AKT celular (Tyr308) em células BT474 na faixa, por exemplo, de 10 nM – 1 μ M.

[000192] Convenientemente, compostos particulares da presente invenção possuem atividade nas concentrações ou doses a seguir em um ou mais dos testes (a) e (c) acima:

Teste (a): - IC₅₀ contra PI3K- α na faixa, por exemplo, de 1 nM - 100 nM;

Teste (c): - IC₅₀ contra fosfo AKT celular (Tyr308) em células BT474 na faixa, por exemplo, de 10 nM – 1 μ M.

[000193] Convenientemente, compostos particulares da presente invenção possuem atividade nas concentrações ou doses a seguir em um ou mais dos testes (a), (c), (h) e (i) acima:

Teste (a): - IC₅₀ contra PI3K- α na faixa, por exemplo, de 1 nM - 100 nM;

Teste (c): - IC₅₀ contra fosfo AKT celular (Tyr308) em células BT474 na faixa, por exemplo, de 10 nM - 1 μ M;

Teste (h): - inibição >50% *in vivo* de fosfo AKT (Ser473) na faixa, por exemplo, de 1-200 mg/kg/dia;

Teste (i): - atividade de xenoenxerto na faixa, por exemplo, de 1-200 mg/kg/dia.

[000194] Os dados a seguir foram gerados para os Exemplos:

Tabela A

Número Exemplo	IC ₅₀ de inibição de PI3K- α (μ M)*	IC ₅₀ de inibição de PI3K- δ (μ M)*	IC ₅₀ de inibição de PI3K- β (μ M)*	IC ₅₀ PI3K- α célula (μ M) **	IC ₅₀ ATR célula (nM)#
1	0,023	<0,014	2,24	0,36	>30
3	0,007	<0,010	0,57	0,09	>30
4	0,025	<0,012	2,91	0,31	>30
5	0,030	0,012	3,31	0,27	>30
6	0,032	<0,012	3,42	0,53	>30
7	0,037	0,014	6,26	0,42	>30
8	0,024	0,012	1,52	0,59	>30
9	<0,010	<0,010	0,640	0,33	-
10	-	-	-	0,085	-
11	-	-	-	0,11	-

[000195] Protocolo de teste a: estes são os valores médios calculados a partir de um determinado número de repetições do teste.

** Protocolo de teste c: estes são os valores médios calculados a partir de um determinado número de repetições do teste.

Protocolo de teste f: uma réplica de teste realizada apenas.

Estudos de Combinação

Materiais e Métodos

[000196] MCF7 é uma linhagem de células de tumor de mama positivo para receptores de estrogênio que traz uma mutação no gene de PIKC3CA (E545K). Camundongos SCID machos (AZ Reino Unido) foram transplantados subcutaneamente (s.c.) com uma linhagem de células de adenocarcinoma de mama humano MCF7 (ICRF London) para determinar a atividade antitumor dos inibidores de quinase PI3. Os camundongos foram implantados com 0,5 mg de um pellet de estrogênio de 21 dias (Innovative Research of America) 24 horas antes de implantação das células. 5×10^6 células em Matrigel a 50% (BD Bioscience) foram injetadas s.c. no flanco esquerdo dos animais.

[000197] BT474 é uma linhagem de células de tumor de mama positiva para receptor de estrogênio com elevada expressão de Her2 e traz uma mutação no gene de PIK3CA (K111NM). Camundongos Swiss nus atímicos fêmeas (swiss nu/nu - AZUK) foram transplantados por via subcutânea com a linhagem de células de carcinoma ductal de mama epitelial humano BT474c (derivado em AZ de BT474 - ATCC HTB-20). Os camundongos foram implantados com 0,36 mg de pellets de estrogênio de 60 dias (Innovative Research of America) 24 horas antes de implantação das células. 5×10^6 células em Matrigel a 50% (BD Bioscience) foram injetadas s.c. no flanco esquerdo dos animais.

[000198] HCC70 é uma linhagem de células de tumor de mama a qual é deficiente na expressão do gene de PTEN. Camundongos Swiss nus atímicos fêmeas (nu/nu Swiss - AZUK) foram transplantados

subcutaneamente com a linhagem de células de tumor de mama ductal epitelial HCC70 (ATCC - CRL2315). 1×10^6 células em Matrigel a 50% (BD Bioscience) foram injetadas s.c. no flanco esquerdo dos animais.

[000199] Os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 10-15 quando os tumores atingiram um volume de $\sim 200-300 \text{ mm}^3$ e o tratamento iniciado. Os animais foram dosados durante 3-4 semanas por via peroral com o composto em um veículo adequado em doses e horários definidos. Os tumores foram medidos duas - três vezes por semana com um calibrador e o volume dos tumores calculado usando a fórmula elíptica ($\pi/6 \times \text{largura} \times \text{largura} \times \text{comprimento}$).

[000200] Quando administrado isoladamente, AZD5363 foi formulado em DMSO a 10%, solução Kleptose a 25%. (Kleptose é fornecida pela Roquette-Pharma (Marca registrada) - hidroxipropil beta-ciclodextrina - adequada para uso *in vivo* e formulações).

[000201] Quando coadministrado com o Exemplo 3, AZD5363 foi formulado em HPMC/Tween (Methocel (hidróxi propil metil celulose) a 0,5%/Polissorbato 80 a 0,1%). A suspensão foi moída durante a noite.

[000202] O Exemplo 3 foi formulado em HPMC/Tween (Methocel (hidróxi propil metil celulose) a 0,5%/Polissorbato 80 a 0,1%).

[000203] AZD8186 foi formulado em HPMC/Tween (Methocel (hidróxi propil metil celulose) a 0,5%/Polissorbato 80 a 0,1%).

[000204] Quando coadministrado com o Exemplo 3, AZD8186 foi formulado em HPMC/Tween (Methocel (hidróxi propil metil celulose) a 0,5%/Polissorbato 80 a 0,1%). A suspensão foi moída durante a noite.

[000205] Olaparibe foi formulado em DMSO a 10%/solução Kleptose a 30%.

Inibição de Crescimento de Tumor pelo Exemplo 3 em Combinação com Inibidor de AKT (AZD5363) - Administração Sequencial

[000206] Estudos foram realizados no modelo de xenoenxerto BT474. Exemplo 3 e AZD5363 foram dosados duas vezes por dia

(BID) 6-8 horas de intervalo em um ciclo semanal de 2 dias de tratamento/5 dias de interrupção em sequência, de modo que AZD5363 fosse dosado nos dias 1 e 2 do ciclo semanal e o Exemplo 3 fosse dosado nos dias 3 e 4 do ciclo semanal. O Exemplo 3 foi dosado em doses de 50 mg/kg BID e AZD5363 foi dosado em doses de 170 mg/kg BID em HPMC/Tween e DMSO/Kleptose, respectivamente.

[000207] A curva de crescimento do tumor (conforme mostrado na Figura 9) indica que a dosagem intermitente de Exemplo 3 ou AZD5363 inibiu parcialmente o crescimento do tumor em relação ao controle com veículo apenas (HPMC/Tween). A combinação do Exemplo 3 mais AZD5363 induziu à regressão do tumor.

Inibição de Crescimento de Tumor pelo Exemplo 3 em Combinação com Inibidor AKT (AZD5363) - Coadministração

[000208] Estudos foram realizados no modelo de xenoenxerto BT474. Exemplo 3 e AZD5363 foram dosados duas vezes por dia (BID) com 6-8 horas de intervalo e, concomitantemente, em um ciclo semanal de 2 dias de tratamento/5 dias de interrupção. Exemplo 3 foi dosado em doses de 25 mg/kg BID e AZD5363 foi dosado em doses de 100 mg/kg BID, ambos em HPMC/Tween.

[000209] A curva de crescimento de tumor (mostrada na Figura 10) indica que a dosagem intermitente de Exemplo 3 ou AZD5363 inibiu parcialmente o crescimento do tumor em relação ao controle com veículo apenas (HPMC/Tween). A combinação do Exemplo 3 mais AZD5363 induziu à regressão do tumor durante o período de dosagem, embora seguido por novo crescimento do tumor durante o período sem dosagem.

Inibição de Crescimento de Tumor pelo Exemplo 3 em Combinação com Inibidor de PARP (Olaparibe)

[000210] Estudos foram realizados no modelo de xenoenxerto BT474. Exemplo 3 e Olaparib foram dosados todos os dias ao longo

do estudo, Exemplo 3 duas vezes por dia (BID) 6-8 horas a 25 mg/kg cada dose e Olaparibe uma vez por dia (QD) a 100 mg/kg 1 hora após a primeira dose diária do Exemplo 3. Ambos os agentes foram administrados em HPMC/Tween.

[000211] A curva de crescimento de tumor (Figura 11) indica que olaparibe apenas não teve efeito significativo sobre o crescimento do tumor, o Exemplo 3 apenas inibiu parcialmente o crescimento, mas a combinação de Exemplo 3 mais olaparibe induziu à regressão do tumor.

Inibição de Crescimento de Tumor pelo Exemplo 3 em Combinação Com Inibidor de PARP (Olaparibe)

[000212] Estudos foram realizados no modelo de xenoenxerto de MCF7. Exemplo 3 e Olaparibe foram dosados todos os dias ao longo do estudo, duas vezes por dia, Exemplo 3 6- 8 horas a 25 mg/kg cada dose e Olaparibe uma vez por dia (QD) a 100 mg/kg 1 hora após a primeira dose diária do Exemplo 3. Ambos os agentes foram administrados em HPMC/Tween.

[000213] A curva de crescimento de tumor (Figura 12) indica que olaparibe apenas teve um efeito mínimo sobre o crescimento do tumor, Exemplo 3 apenas causou alguma regressão do tumor, mas a combinação de Exemplo 3 mais olaparibe induziu a uma regressão mais forte do tumor.

Inibição de Crescimento de Tumor pelo Exemplo 3 em Combinação Com Inibidor de PI3Kbeta/delta (AZD8186)

[000214] Estudos foram realizados no modelo de xenoenxerto HCC70. Exemplo 3 e AZD8186 foram dosados todos os dias, duas vezes ao dia (bid), durante todo o estudo, Exemplo 3 a 25 mg/kg cada dose e AZD8186 a 50 mg/kg cada dose. Ambos os agentes foram administrados em HPMC/Tween. A curva de crescimento do tumor (Figura 13) indica que o AZD8186 inibiu parcialmente o crescimento do tu-

mor, Exemplo 3 apenas inibiu o crescimento do tumor de modo mais forte, mas a combinação do Exemplo 3 mais AZD8186 induziu à regressão do tumor.

[000215] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é fornecido uma composição farmacêutica a qual compreende um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, em associação com um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[000216] Excipientes farmaceuticamente aceitáveis adequados para uma formulação em comprimido incluem, por exemplo, diluentes inertes, agentes de granulação e desintegrantes, agentes aglutinantes, agentes lubrificantes, agentes conservantes e antioxidantes. As formulações em comprimido podem ser não revestidas ou revestidas, seja para modificar sua desintegração e subsequente absorção do ingrediente ativo no trato gastrintestinal, ou para melhorar sua estabilidade e/ou aparência, em qualquer caso, usando agentes de revestimento convencionais e procedimentos bem conhecidos na técnica.

[000217] As composições para uso oral podem estar, alternativamente, na forma de cápsulas de gelatina dura, nas quais o ingrediente ativo é misturado com um diluente sólido inerte, ou como cápsulas de gelatina mole, nas quais o ingrediente ativo é misturado com água ou um óleo.

[000218] As suspensões aquosas contêm, em geral, o ingrediente ativo em uma forma finamente pulverizada em conjunto com um ou mais agentes de suspensão, agentes dispersantes ou agentes umectantes. As suspensões aquosas também podem conter um ou mais conservantes, antioxidantes, agentes de coloração, agentes de flavorização e/ou agentes edulcorantes.

[000219] Suspensões oleosas podem ser formuladas suspendendo o ingrediente ativo em um óleo vegetal ou um óleo mineral. As suspen-

sões oleosas também podem conter um agente de espessamento. Agentes edulcorantes, tais como aqueles apresentados acima, e agentes de flavorização podem ser adicionados para proporcionar um preparado oral palatável. Estas composições podem ser conservadas mediante adição de um antioxidante.

[000220] Os pós dispersíveis e grânulos adequados para preparo de uma suspensão aquosa mediante adição de água contêm, em geral, o ingrediente ativo em conjunto com um agente dispersante ou umectante, agente de suspensão e um ou mais conservantes. Excipientes adicionais, tais como agentes edulcorantes, flavorizantes e colorantes, também podem estar presentes.

[000221] As composições farmacêuticas da invenção também podem estar na forma de emulsões óleo-em-água. A fase oleosa pode ser um óleo vegetal ou um óleo mineral ou uma mistura de qualquer um dos mesmos. As emulsões também podem conter agentes edulcorantes, flavorizantes e conservantes.

[000222] Xaropes e elixires podem ser formulados com agentes edulcorantes e também podem conter um demulcente, conservante, flavorizante e/ou colorante.

[000223] As composições farmacêuticas também podem estar na forma de uma suspensão aquosa ou oleosa injetável estéril, a qual pode ser formulada de acordo com procedimentos conhecidos usando um ou mais dos dispersantes ou umectantes e agentes de suspensão adequados que foram mencionados acima. Um preparado injetável estéril pode também ser uma solução ou suspensão injetável estéril em um diluente ou solvente parenteralmente aceitável não tóxico.

[000224] As composições para administração por inalação podem estar na forma de um aerossol pressurizado convencional preparado para dispensar o ingrediente ativo como um aerossol contendo gotículas sólidas ou líquidas finamente divididas. Propelentes de aerossol

convencionais, tais como os hidrocarbonetos fluorados voláteis, podem ser usados e o dispositivo de aerossol é, convenientemente, preparado para administrar uma quantidade medida de ingrediente ativo.

[000225] Para mais informações sobre formulação o leitor deve consultar o Capítulo 25.2 no Volume 5 de *Comprehensive Medicinal Chemistry* (Corwin Hansch; Presidente do Conselho Editorial), Pergamon Press 1990.

[000226] A quantidade de ingrediente ativo que é combinada com um ou mais excipientes para produzir uma forma de dosagem individual variará necessariamente dependendo do hospedeiro tratado e da via particular de administração. Por exemplo, administração oral a seres humanos geralmente requererá, por exemplo, de 1 mg a 2 g de agente ativo (mais adequadamente de 100 mg a 2 g, por exemplo, de 250 mg a 1,8 g, tal como de 500 mg a 1,8 g, particularmente de 500 mg a 1,5 g, convenientemente de 500 mg a 1 g), a ser administrado misturado com uma quantidade apropriada e conveniente de excipientes que pode variar de cerca de 3 a cerca de 98 por cento em peso da composição total. Deverá ser entendido que, se uma grande dosagem é necessária, várias formas de dosagem podem ser necessárias, por exemplo, dois ou mais comprimidos ou cápsulas, com a dose de ingrediente ativo convenientemente dividida entre eles. Convenientemente, uma única forma de dosagem sólida pode conter entre 1 e 300 mg de ingrediente ativo.

[000227] O tamanho da dose para fins terapêuticos ou profiláticos de um composto de Fórmula (I) naturalmente variará de acordo com a natureza e gravidade do estado patológico, a idade e o sexo do animal ou paciente e a via de administração, de acordo com princípios bem conhecidos de medicina.

[000228] Ao usar um composto de Fórmula (I) para fins terapêuticos ou profiláticos, em geral ele será administrado de modo que uma dose

diária na faixa, por exemplo, de 1 mg/kg a 5 100 mg/kg de peso corporal, seja recebida, se necessário administrada em doses divididas. Em geral, doses menores serão administradas quando uma via parenteral é usada. Assim, por exemplo, para administração intravenosa, uma dose na faixa, por exemplo, de 1 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal, geralmente será usada. Similarmente, para administração por inalação, uma dose na faixa, por exemplo, de 1 mg/kg a 25 mg/kg de peso corporal será usada. A administração oral, contudo, é preferida, em particular na forma de comprimido. Tipicamente, formas de dosagem unitárias conterão cerca de 10 mg a 0,5 g de um composto da presente invenção.

[000229] Os compostos da invenção podem ser administrados diariamente ou mais de uma vez por dia. Os compostos da invenção também podem ser administrados em um horário de dosagem adequado, por exemplo, os compostos da invenção podem ser administrados uma ou mais vezes por dia (por exemplo, uma vez, duas vezes ou três vezes por dia) durante um determinado número de dias, seguido por um período de dias em que nenhuma dose é administrada. Este ciclo de dosagem (que consiste em dias de dosagem e dias sem dosagem) pode, então, ser repetido. Convenientemente, um ciclo de dosagem é um período de 5-14 dias, tal como 5, 7, 10 ou 14 dias, mais convenientemente 7 dias. Em um aspecto, os compostos de fórmula (I) são dosados durante um dia ou dois ou três dias consecutivos, seguido por 3, 4, 20 5 ou 6 dias sem nenhuma dose em um ciclo de dosagem.

[000230] Em um aspecto, o composto de fórmula (I) é administrado durante 1 dia, seguido por nenhuma dose durante 2, 3 ou 4 dias.

[000231] Em outro aspecto, o composto de fórmula (I) é administrado durante 2 dias, seguido por nenhuma dose durante 4, 5 ou 6 dias.

[000232] Em outro aspecto, o composto de fórmula (I) é administrado durante 3 dias, seguido por nenhuma dose durante 3, 4 ou 5 dias.

[000233] Em outro aspecto, o composto de fórmula (I) é administrado durante 4 dias, seguido por nenhuma dose durante 2, 3 ou 4 dias.

[000234] Em outro aspecto, o composto de fórmula (I) é administrado durante 5 dias, seguido por nenhuma dose durante 1, 2 ou 3 dias.

[000235] Em outro aspecto, o composto de fórmula (I) é administrado em dias alternados.

[000236] Os esquemas de dosagem acima são, convenientemente, aplicados quando os compostos da invenção são usados como monoterapia. Outros exemplos de possíveis esquemas de dosagem para administração dos compostos da invenção, tal como terapia combinada, são descritos a seguir.

[000237] Conforme afirmado acima, sabe-se que as enzimas PI3K- α e $-\delta$ contribuem para a tumorigênese por um ou mais dos efeitos de mediar a proliferação de células cancerosas e outras, mediar eventos angiogênicos e mediar a motilidade, migração e invasão de células cancerosas. Descobriu-se que os compostos da presente invenção possuem atividade antitumor potente, a qual se acredita ser obtida por meio de inibição de enzimas PI3K- α e $-\delta$ que estão envolvidas nas etapas de transdução de sinal que levam à proliferação e sobrevivência de células tumorais e a invasividade e capacidade migratória das células tumorais em metástase.

[000238] Consequentemente, os compostos da presente invenção são de valor como agentes antitumor, em particular como inibidores seletivos de proliferação, sobrevivência, motilidade, difusão e invasividade de células cancerosas de mamífero que levam à inibição de crescimento e sobrevivência do tumor e inibição de crescimento de tumor metastático. Particularmente, os compostos da presente invenção são de valor como agentes antiproliferativos e anti-invasivos na contenção e/ou tratamento de doenças por tumor sólido. Particularmente, espera-se que os compostos da presente invenção sejam úteis

na prevenção ou tratamento daqueles tumores os quais são sensíveis à inibição das enzimas PI3K- α e/ou $-\delta$ e que estão envolvidas nas etapas de transdução de sinal que levam à proliferação e sobrevivência de células tumorais e a capacidade migratória e invasividade de células tumorais em metástase. Além disso, espera-se que os compostos da presente invenção sejam úteis na prevenção ou tratamento daqueles tumores os quais são mediados apenas ou em parte pela inibição das enzimas PI3K- α e/ou $-\delta$, isto é, os compostos podem ser usados para produzir um efeito inibidor de enzima PI3K- α e/ou $-\delta$ em um animal de sangue quente que precisa de tal tratamento.

[000239] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso como um medicamento em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000240] De acordo com um outro aspecto da invenção, é proporcionado um composto da Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso na produção de um efeito antiproliferativo em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000241] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso em um animal de sangue quente, tal como o homem, como um agente anti-invasivo na contenção e/ou tratamento de doenças por tumor sólido.

[000242] De acordo com um outro aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para produção de um efeito antiproliferativo em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000243] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso na produção de um efeito antiproliferativo em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000244] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso em um de sangue quente animal, tal como o homem, como um agente anti-invasivo na contenção e/ou tratamento de doenças por tumor sólido.

[000245] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para produção de um efeito antiproliferativo em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento compreendendo administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000246] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para produção de um efeito anti-invasivo para contenção e/ou tratamento de doenças por tumor sólido em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento compreendendo administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000247] De acordo com um outro aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso na prevenção ou tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000248] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, no preparo de um medicamento para uso na prevenção ou tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000249] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para prevenção ou tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento compreendendo administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000250] De acordo com um outro aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso na prevenção ou tratamento de doenças por tumor sólido em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000251] De acordo com um aspecto adicional da invenção é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso na prevenção ou tratamento de doenças por tumor sólido em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000252] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para prevenção ou tratamento de doenças por tumor sólido em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento compreendendo administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000253] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto da Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso na prevenção ou tratamento daqueles tumores que são sensíveis à inibição das enzimas PI3K- α e/ou $-\delta$ que estão envolvidas em etapas de transdução de sinal que levam à proliferação, sobrevivência, invasividade e capacidade migratória das células tumorais.

[000254] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso na prevenção ou tratamento daqueles tumores que são sensíveis à inibição das enzimas PI3K- α e/ou $-\delta$ que estão envolvidas em etapas de transdução de sinal que levam à proliferação, sobrevivência, invasividade e capacidade migratória das células tumorais.

[000255] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para prevenção ou tratamento dos tumores que são sensíveis à inibição das enzimas PI3K- α e/ou $-\delta$ que estão envolvidas em etapas de transdução de sinal que levam à proliferação, sobrevivência, invasividade e capacidade migratória das células tumorais que consiste em administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000256] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto da Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso no fornecimento de um efeito inibidor das enzimas PI3K- α e $-\delta$.

[000257] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui

antes, no preparo de um medicamento para uso no fornecimento de um efeito inibidor das enzimas PI3K- α e - δ .

[000258] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado também um método para proporcionar um efeito inibidor das enzimas PI3K- α e/ou - δ compreendendo administração de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000259] Conforme dito aqui antes, determinados compostos da presente invenção possuem uma potência substancialmente melhor contra as enzimas PI3K- α e - δ do que contra outras enzimas quinases PI3 ou outras quinases. Tais compostos possuem uma potência suficiente contra as enzimas PI3K- α e - δ que eles podem ser usados em uma quantidade suficiente para inibir as enzimas PI3K- α e - δ , ao mesmo tempo em que demonstram pouca atividade contra a enzima PI3K- β e contra a maioria das outras enzimas quinase. Provavelmente, tais compostos são úteis para inibição seletiva as enzimas PI3K- α e - δ e provavelmente são úteis para o tratamento eficaz, por exemplo, de tumores ativados pelas enzimas PI3K- α e/ou - δ .

[000260] De acordo com este aspecto da invenção, é proporcionado um composto da Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso no fornecimento de um efeito inibidor seletivo das enzimas PI3K- α e - δ .

[000261] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso no fornecimento de um efeito inibidor seletivo das enzimas PI3K- α e - δ .

[000262] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionado também um método para proporcionar um efeito inibidor seletivo das enzimas PI3K- α e - δ o qual compreende administração de

uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000263] Por "um efeito inibidor seletivo das enzimas PI3K- α e - δ " entenda-se que o composto da Fórmula (I) é mais potente contra as enzimas PI3K- α e - δ do que contra outras quinases PI3 de classe 1 e, em geral, exibem uma boa seletividade em relação a outros membros da família de quinases PI3 e classes mais amplas de enzimas quinase que compreendem tirosina e ser/thr quinases.

[000264] De acordo com uma característica adicional da invenção, é proporcionado um composto da Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso no tratamento de câncer de mama, câncer de estômago (gástrico) e câncer do esôfago, câncer de pulmão de células não pequenas (**Non Small Cell Lung Cancer - NSCLC**), incluindo carcinomas de células escamosas (**Squamous Cell Carcinoma - SCC**) e adenocarcinoma, carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (H&N), cânceres ginecológicos (incluindo endométrio, ovário e colo do útero) e cânceres hematológicos, tais como mieloma múltiplo, linfomas e leucemias (incluindo leucemia linfocítica crônica (**Chronic Lymphocytic Leukaemia - CLL**), leucemia linfoblástica aguda (**Acute Lymphoblastic Leukaemia - ALL**) e linfoma de células do manto (**Mantle Cell Lymphoma - MCL**).

[000265] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso no tratamento de câncer da bexiga, cérebro/SNC, colorretal, pulmão (todas as outras formas), vesícula biliar e dutos biliares, e pele.

[000266] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, para uso no tratamento de câncer de próstata, osso, rim, fígado, mel-

noma, gastrintestinal, pâncreas, testículos, tiroide, pênis, vulva e outros tipos de tumores com uma dependência de quinases PI3 por meio de mutação, amplificação ou outras aberrações.

[000267] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para o tratamento de câncer de mama, estômago (gástrico) e esôfago, NSCLC, incluindo SCC e adenocarcinoma, SCC de H&N, cânceres ginecológicos (incluindo endométrio, ovário e colo do útero) e cânceres hematológicos, tais como mieloma múltiplo, linfomas e leucemias (incluindo CLL, ALL e MCL) em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento compreendendo administração de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000268] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para o tratamento de câncer da bexiga, cérebro/SNC, colorretal, pulmão (todas as outras formas), vesícula biliar e dutos biliares e pele em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento compreendendo administração de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000269] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado um método para tratamento de câncer de próstata, osso, rim, fígado, melanoma, gastrintestinal, pâncreas, testículos, tiroide, pênis, vulva e outros tipos de tumores com uma dependência de quinases PI3 por meio de mutação, amplificação ou outras aberrações, em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento compreendendo administração de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes.

[000270] De acordo com uma característica adicional da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer de mama, estômago (gástrico) e esôfago, NSCLC, incluindo SCC e adenocarcinoma, SCC de H&N, cânceres ginecológicos (incluindo endométrio, ovário e colo do útero) e cânceres hematológicos, tais como mieloma múltiplo, linfomas e leucemias (incluindo CLL, ALL e MCL).

[000271] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer da bexiga, cérebro/SNC, colorretal, pulmão (todas as outras formas), vesícula biliar e dutos biliares e pele.

[000272] De acordo com uma outra característica deste aspecto da invenção, é proporcionado o uso de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, conforme definido aqui antes, na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer de próstata, osso, rim, fígado, melanoma, gastrintestinal, pâncreas, testículos, tireoide, pênis, vulva e outros tipos de tumores com uma dependência de quinases PI3 por meio de mutação, amplificação ou outras aberrações.

[000273] Em uma característica da invenção, o câncer a ser tratado é câncer de mama. Em um outro aspecto desta característica, o câncer de mama é positivo para o receptor de estrogênio. Em uma modalidade do presente aspecto, o composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo é administrado em combinação com um agente anti-hormonal, conforme definido aqui. Em uma outra modalidade deste aspecto, o Exemplo 3 é administrado em combinação com um agente anti-hormonal, conforme definido aqui. Em uma

outra modalidade deste aspecto, o Exemplo 3 é administrado em combinação com olaparibe ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e opcionalmente ainda em combinação com um agente anti-hormonal, conforme definido aqui. Em uma outra modalidade deste aspecto, o Exemplo 3 é administrado em combinação com AZD5363 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, e opcionalmente ainda em combinação com um agente anti-hormonal, conforme definido aqui.

[000274] Em um aspecto onde o tratamento de câncer é indicado, deverá ser entendido que isto pode se referir à prevenção de metástases e tratamento de metástases, isto é, disseminação de câncer. Consequentemente, os compostos da presente invenção podem ser usados para tratar um paciente que não tem metástases para impedir sua ocorrência, ou prolongar o período de tempo antes que elas ocorram, e em um paciente que já tem metástases para tratá-las. Além disso, o tratamento de câncer pode se referir ao tratamento de um tumor ou tumores primários estabelecidos e desenvolvimento de tumor ou tumores primários. Portanto, em um aspecto, o tratamento de câncer refere-se à prevenção de metástases. Em um outro aspecto da invenção, o tratamento de câncer refere-se ao tratamento de metástases. Em um outro aspecto da invenção, o tratamento de câncer refere-se ao tratamento de um tumor ou tumores primários estabelecidos ou desenvolvimento de um tumor ou tumores primários.

[000275] Conforme afirmado aqui antes, os efeitos *in vivo* de um composto de Fórmula (I) podem ser exercidos, em parte, por um ou mais metabólitos (tais como os compostos de fórmula A, conforme definido aqui antes) que são formados no interior do corpo de um ser humano ou animal após administração de um composto de Fórmula (I).

[000276] Compostos particulares da invenção possuem uma melhor

potência contra quinases PI3- α e - δ do que contra outras isoformas quinases PI3 de classe I, tais como - β e - γ . Em um aspecto, os compostos da invenção são seletivos para PI3K- α e - δ comparado com PI3K- β ou - γ .

[000277] A presente invenção, portanto, também considera um método para inibição de quinases PI3- α em um paciente compreendendo administração, a um paciente, de uma quantidade do composto de Fórmula (I), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, eficaz na inibição da quinase PI3- α no paciente.

[000278] A presente invenção também considera, portanto, um método para inibição de quinase PI3- α e - δ em um paciente compreendendo administração, a um paciente, de uma quantidade do composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, eficaz na inibição das quinases PI3- α e - δ no paciente.

[000279] O composto de Fórmula (I), ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, sendo um inibidor de quinases PI3, também tem usos terapêuticos potenciais em uma variedade de outros estados patológicos. Por exemplo, quinases PI3 desempenham um papel importante na promoção de proliferação de músculo liso na árvore vascular, isto é, células do músculo liso vascular (Thyberg, European Journal de Cell Biology, 1998, 76(1), 33-42), e nos pulmões (células do músculo liso das vias aéreas), Krymskaya, V.P., BioDrugs, 2007, 21(2), 85-95. Proliferação excessiva de células do músculo liso vascular desempenha um papel importante na formação de placas ateroscleróticas e no desenvolvimento de hiperplasia neointimal após procedimentos vasculares invasivos (Swartz *et al.*, Progress in Cardiovascular Disease, 1984, 26, 355-372; Clowes *et al.*, Laboratory Investigations, 1978, 39, 141-150). Além disso, proliferação excessiva de células do músculo liso das vias aéreas leva ao desenvolvimento de COPD no contexto de asma e bronquite crônica. Inibidores da atividade de quinases PI3, por-

tanto, podem ser usados para prevenir restenose vascular, aterosclerose e COPD.

[000280] Quinases PI3 também desempenham um papel importante na função de leucócitos (Fuller *et al.*, The Journal de Immunology, 1999, 162(11), 6337-6340; Eder *et al.*, The Journal de Biological Chemistry, 1998, 273(43), 28025-31) e função de linfócitos (Vicente-Manzanares *et al.*, The Journal de Immunology, 1999, 163(7), 4001-4012). Por exemplo, a adesão de leucócitos ao endotélio inflamado envolve a ativação de integrinas de leucócitos endógenos por meio de um processo de sinalização dependente de quinases PI3. Além disso, a explosão oxidativa (Nishioka *et al.*, FEBS Letters, 1998, 441(1). 63-66 e Condliffe, A.M. *et al.*, Blood, 2005, 106(4). 1432-40) e reorganização do citoesqueleto (Kirsch *et al.*, Proceedings National Academy de Sciences USA, 1999, 96(11), 6211-6216) em neutrófilos parece envolver a sinalização de quinases PI3. Migração e movimento direcional de neutrófilos também são dependentes da atividade de quinases PI3 (Camps, M., *et al.*, Nat Med. 2005, 11(9). 936-43 e Sadhu, C. *et al.*, J Immunol. 2003, 170(5), 2647-54). Assim, inibidores de quinases PI3 podem ser úteis na redução da adesão e ativação de leucócitos em locais de inflamação e, conseqüentemente, podem ser usados para tratar doenças inflamatórias agudas e/ou crônicas. Quinases PI3 também desempenham um papel importante na proliferação e ativação de linfócitos (Fruman *et al.*, Science, 1999, 283 (5400), 393-397). Em particular, PI3K- δ é essencial para o desenvolvimento e função de células B, incluindo proliferação de células B induzida por anticorpo específico para IgM (Okkenhaug K. *et al.*, Science, 2002, 297(5583). 1031-1034), síntese de DNA induzida por receptor de células B e proliferação e sobrevivência induzidas por IL-4 (Bilancio A. *et al.*, Blood, 2006, 107, 642-650). Estas observações indicam que PI3K- δ tem um papel crucial e não redundante sobre a função de células B, o qual não é compen-

sado por outras PI3Ks de classe I. Dado o papel importante dos linfócitos em doenças autoimunes, um inibidor da atividade de quinases PI3 pode ser usado no tratamento de tais dispositivos (Rommel C, Camps M e Ji H, Nat Rev Immunol. 2007, 1038, 191-201).

[000281] O tratamento anticâncer definido aqui antes pode ser aplicado como uma terapia única ou pode envolver, além do composto da invenção, cirurgia convencional ou radioterapia e quimioterapia convencionais. Tal quimioterapia pode incluir uma ou mais das seguintes categorias de agentes antitumor:

(i) fármacos antiproliferativos/antineoplásicos e combinações dos mesmos, conforme usado em oncologia médica, tais como agentes de alquilação (por exemplo, cisplatina, oxaliplatina, carboplatina, ciclofosfamida, mostarda nitrogenada, melfalano, clorambucil, busulfano, temozolamida e nitrosoureas); antimetabólitos (por exemplo, gencitabina e antifolatos, tais como fluoropirimidinas, tais como 5-fluorouracila e tegafur, raltitrexed, metotrexato, citosina arabinosídeo e hidroxiureia); antibióticos antitumor (por exemplo, antraciclinas, tais como adriamicina, bleomicina, doxorrubicina, daunomicina, epirrubicina, idarrubicina, mitomicina-C, dactinomicina e mitramicina); agentes antimitóticos (por exemplo, vinca alcaloides, tais como vincristina, vinblastina, vindesina e vinorelbina, e taxoides, tais como taxol e taxotero, e inibidores de poloquinase); e inibidores de topoisomerase (por exemplo, epipodofilotoxinas, tais como etoposídeo e teniposídeo, ansacrina, topotecano e camptotecina);

(ii) agentes anti-hormonais, tais como antiestrogênios (por exemplo, tamoxifeno, fulvestrante, toremifeno, raloxifeno, droloxifeno e iodoxifeno), antiandrogênios (por exemplo, bicalutamida, flutamida, nilutamida e acetato de ciproterona), antagonistas de LHRH ou agonistas de LHRH (por exemplo, goserelina, leuprorelina e buserelina), progestogênios (por exemplo, acetato de megestrol), inibidores de aroma-

tase (por exemplo, anastrozol, letrozol, vorazol e exemestano) e inibidores de 5 α -redutase, tal como finasterida;

(iii) inibidores de função do fator de crescimento e suas vias de sinalização a jusante: incluídos estão Ab moduladores de qualquer fator de crescimento ou alvos de receptor de fator de crescimento (revisito por Stern *et al.* Critical Reviews in Oncology/Haematology, 2005, 54, páginas 11-29); também estão incluídos inibidores de pequenas moléculas de tais alvos, por exemplo, inibidores de quinase - exemplos incluem o anticorpo anti-ErbB2™ trastuzumabe [Herceptin], o anticorpo anti-EGFR panitumumabe, o anticorpo anti-EGFR cetuximabe [Erbix, C225] e inibidores de quinases tirosina, incluindo inibidores da família de receptores erbB, tais como inibidores de tirosina quinase receptoras da família do fator de crescimento epidérmico (EGFR/erbB1), tais como gefitinibe ou erlotinibe, inibidores de tirosina quinase erbB2, tal como lapatinibe, e inibidores mistos de erb1/2, tal como afatinibe; estratégias similares estão disponíveis para outras classes de fatores de crescimento e seus receptores, por exemplo, inibidores da família do fator de crescimento de hepatócitos ou seus receptores, incluindo ron e c-met; inibidores de insulina e da família do fator de crescimento de insulina e seus receptores (IGFR, IR), inibidores da família de fator de crescimento derivado de plaquetas ou seus receptores (PDGFR) e inibidores da sinalização mediada por outras tirosina quinases receptoras, tais como c-kit, AnLK e CSF-1R; também estão incluídos moduladores que têm como alvo proteínas de sinalização na via de sinalização de quinases PI3 mais ampla, por exemplo, inibidores de outras isoformas de quinases PI3, tal como PI3K- β , e ser/thr quinases, tais como AKT, mTOR, PDK, SGK, PI4K ou PIP5K; também estão incluídos inibidores de serina/treonina quinases não listados acima, por exemplo, inibidores de raf, tal como vemurafenibe, inibidores de MEK, tal como selumetinibe (AZD6244), inibidores de Abl, tais como imatini-

be ou nilotinibe, inibidores de Btk, tal como ibrutinibe, inibidores de Syk, tal como fostamatinibe, inibidores da quinase aurora (por exemplo AZD1152), inibidores de outras Ser/Ter quinases, tais como JAKs, STATs e IRAK4, e inibidores de quinase dependente de ciclina;

(iv) moduladores de vias de sinalização de danos ao DNA, por exemplo, inibidores de PARP (por exemplo, olaparibe), inibidores de ATR ou inibidores de ATM;

(v) moduladores de vias apoptóticas e morte celular, tais como moduladores da família Bcl (por exemplo, ABT-263/Navitoclax, ABT-199);

(vi) agentes antiangiogênicos, tais como aqueles que inibem os efeitos do fator de crescimento endotelial vascular [por exemplo, o anticorpo antifator de crescimento de células endoteliais vascular bevacizumabe (Avastin™) e, por exemplo, um inibidor de tirosina quinase do receptor de VEGF, tal como sorafenibe, axitinibe, pazopanibe, sunitinibe e vandetanibe (e compostos que funcionam através de outros mecanismos (por exemplo, linomida, inibidores de função de integrina $\alpha\beta3$, e angiostatina)];

(vii) agentes de dano vascular, tal como Combretastatina A4;

(viii) agentes anti-invasão, por exemplo, inibidores da família de quinases c-Src (dasatinibe, Med. Chem., 2004, 47, 6658-6661) e bosutinibe (SKI-606), e inibidores de metaloproteinase, tal como marimastate, inibidores de função do receptor de ativador de plasminogênio de uroquinase ou anticorpos à heparanase];

(ix) abordagens de imunoterapia incluindo, por exemplo, abordagens *in vivo* e *ex vivo*, para aumentar a imunogenicidade das células tumorais do paciente, tal como transfecção com citocinas, tais como interleucina 2, interleucina 4 ou fator estimulador de colônias granulócito-macrófago, abordagens para diminuir a anergia de células

T, abordagens usando células imunes transfectadas, tais como células dendríticas transfectadas com citocinas, abordagens usando linhagens de células tumorais transfectadas com citocinas e abordagens usando anticorpos anti-idiotípicos. Exemplos específicos incluem anticorpos monoclonais que objetivam a PD-1 (por exemplo, BMS-936558) ou CTLA4 (por exemplo, ipilimumabe e tremelimumabe);

(x) terapias antissenso ou com base em RNAi, por exemplo, aquelas que são dirigidas aos alvos listados;

(xi) abordagens de terapia genética incluindo, por exemplo, abordagens para substituir genes aberrantes, tal como p53 aberrante ou BRCA1 ou BRCA2 aberrante, abordagens de terapia com profármaco enzimático gene-dirigida (**Gene-Directed Enzyme Pro-Drug Therapy – GDEPT**), tais como aquelas que usam citosina-desaminase, timidina-quinase ou uma enzima nitrorredutase bacteriana e abordagens para aumentar a tolerância do paciente à quimioterapia ou radioterapia, tal como terapia gênica de resistência a múltiplos fármacos.

[000282] De acordo com este aspecto da invenção, é fornecida uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e outro agente antitumor, em particular qualquer um dos agentes antitumor listados sob (i) - (xi) acima. Em particular, o agente antitumor listado em (i) - (xi) acima é o tratamento padrão para o câncer específico a ser tratado; Aqueles versados na técnica entenderão o significado de "tratamento padrão".

[000283] Portanto, em um outro aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com outro agente antitumor, em particular um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima.

[000284] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um

composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com outro agente antitumoral, em particular um agente antitumoral selecionado a partir de um listado em (i) acima.

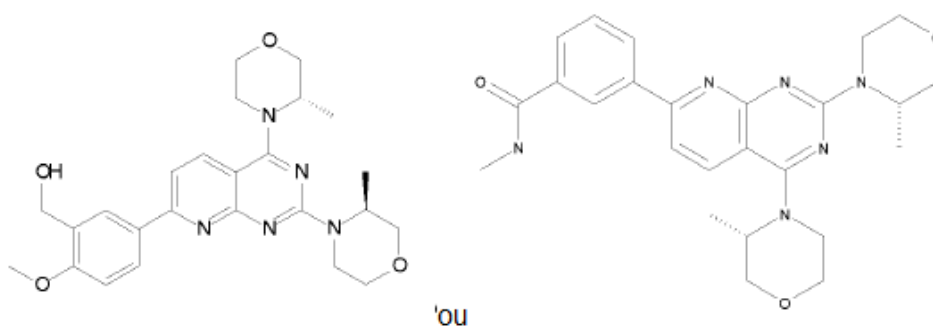
[000285] Em outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e qualquer um dos agentes antitumor listados sob (i) acima.

[000286] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e um taxóide tal como, por exemplo, taxol ou taxotero, convenientemente taxotero.

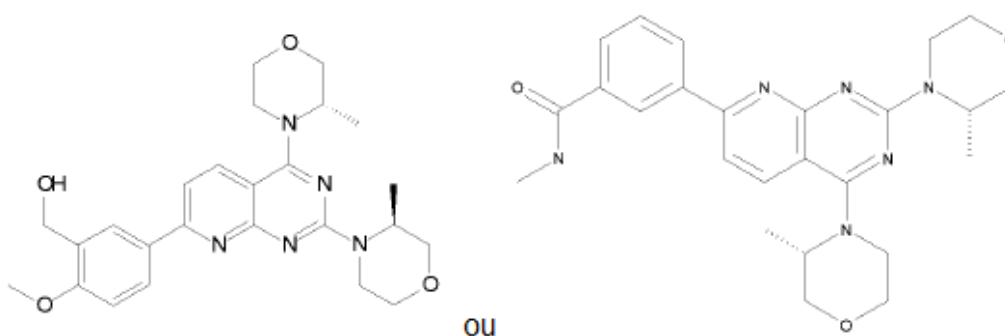
[000287] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou é um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com outro agente antitumoral, em particular um agente antitumoral selecionado a partir de um listado em (ii) aqui acima.

[000288] Em outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e qualquer um dos agentes anti-hormonais listados sob (ii) acima, por exemplo, qualquer um dos antiestrogênios listados em (ii) acima.

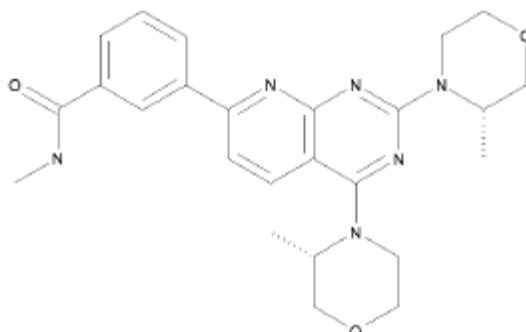
[000289] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com um inibidor de mTOR, tais como aqueles descritos no documento WO2008/023161, por exemplo:



[000290] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e um inibidor de mTOR, tais como aqueles descritos no documento WO2008/023161, por exemplo:



[000291] Em particular, o inibidor de mTOR é AZD2014, o qual tem a estrutura a seguir:



[000292] Em um aspecto, a combinação acima do composto de fórmula (I) e AZD2014 é adequada para uso no tratamento de câncer de mama positivo para ER, opcionalmente em combinação com o tratamento padrão de terapia hormonal.

[000293] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com um inibidor de PI3K- β .

[000294] A combinação de um composto de fórmula (I) com um inibidor de PI3K- β pode ser particularmente útil no tratamento de tumores, por exemplo, de próstata, mama (por exemplo, mama triplo negativo), NSCLC de células escamosas e câncer renal, com um base em perda de PTEN.

[000295] Em um outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e um inibidor de PI3K- β .

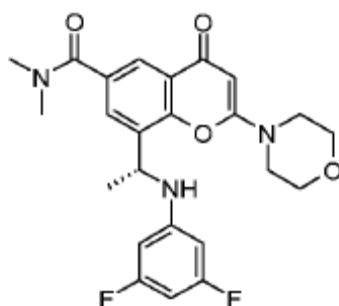
[000296] Em um aspecto, os inibidores de PI3K- β descritos aqui também têm alguma atividade inibidora de PI3K- δ .

[000297] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com um inibidor de PI3K- β , tal como qualquer um dos exemplos no Pedido de Patente Internacional WO2011/051704.

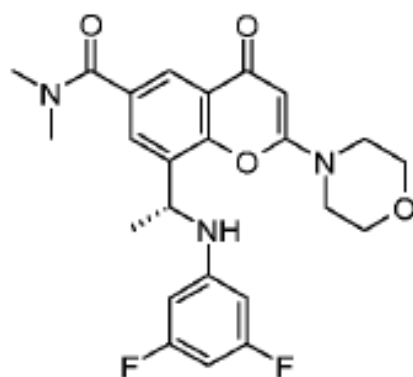
[000298] Em outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e um inibidor de PI3K- β , tal como qualquer um dos exemplos no Pedido de Patente Internacional WO2011/051704.

[000299] Em outro aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com um inibidor de PI3K- β e PI3K- δ , tal como 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenilamino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-

6-carboxamida (Exemplo 3.06b no Pedido de Patente Internacional WO2011/051704, também conhecido como AZD8186) ou um farmacologicamente aceitável do mesmo:



[000300] Em outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e um inibidor de PI3K- β e PI3K- δ , tal como 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenilamino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-6-carboxamida (exemplo 3.06b no Pedido de Patente Internacional WO2011/051.704, também conhecido como AZD8186) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo:



[000301] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em combinação com um inibidor de AKT quinase, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxipropil)-1-(7H-pirroló[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida (AZD5363) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo (vide, por exemplo, documento WO2009/047563).

[000302] A combinação de um composto de Fórmula (I) e um inibidor de AKT pode ser particularmente útil no tratamento de tumores com uma prevalência maior de mutações no gene de PIK3CA, tais como câncer de mama positivo para ER, câncer de endométrio, câncer de ovário, NSCLC de células escamosas, câncer gástrico, câncer de bexiga e câncer do trato biliar.

[000303] Em outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e um inibidor de quinase AKT, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxiopropil)-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida (AZD5363) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo (vide, por exemplo, documento WO2009/047563).

[000304] Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em combinação com olaparibe (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-benzil]-2H-ftalazin-1-ona) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[000305] A combinação de um composto de Fórmula (I) e olaparibe pode ser particularmente útil, tanto em câncer de mama triplo negativo, de tipo selvagem ou deficiente de BRCA, quanto em câncer de mama positivo para o receptor de estrogênio (ER+ve), particularmente aqueles com mutações no gene de PIK3CA.

[000306] Em outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação adequada para uso no tratamento de câncer compreendendo um composto de Fórmula (I) conforme definido aqui antes ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo e olaparibe (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-benzil]-2H-ftalazin-1-ona) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo.

[000307] Combinações particulares da invenção compreendem qualquer um dos compostos dos Exemplos aqui (ou um sal farmacêuticamente aceitável dos mesmos) e um inibidor de mTOR, inibidor de PI3K- β , inibidor de quinase AKT ou olaparibe, conforme descrito aqui acima. Outras combinações particulares da invenção compreendem Exemplo 3 (ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo) e um inibidor de mTOR, inibidor de PI3K- β , inibidor de quinase AKT ou olaparibe, conforme descrito aqui acima. Outras combinações particulares da invenção compreendem Exemplo 3 (ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo) e um inibidor de PI3K- β , inibidor de quinase AKT ou olaparibe (ou um sal farmacêuticamente aceitável de qualquer um dos mesmos), conforme descrito aqui acima. Mais particularmente, exemplos de combinações da invenção compreendem Exemplo 3 (ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo) e qualquer um de AZD8186, AZD5363 e olaparibe (ou um sal farmacêuticamente aceitável de qualquer um dos mesmos). Outro exemplo de uma combinação da invenção compreende Exemplo 3 e AZD2014.

[000308] Em todas as combinações acima, deverá ser entendido que a combinação também pode ser dosada com o tratamento padrão, conforme entendido por aqueles versados na técnica, tais como outros tratamentos de (i) a (xi) aqui antes. Por exemplo, quando se pretende usar qualquer uma das combinações acima para o tratamento de câncer de mama ER+ve, o tratamento padrão com terapia hormonal (por exemplo, os agentes listados em (ii) acima) pode ser usado em conjunto com a combinação da invenção. Em outros aspectos, adequadamente, o tratamento padrão pode ser selecionado a partir de (i) acima.

[000309] Portanto, em um outro aspecto da invenção, é proporcionada uma combinação tripla apropriada para uso no tratamento de câncer de:

um composto de fórmula (I) (tal como Exemplo 3) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo;

um inibidor de mTOR, inibidor de PI3K- β , inibidor de quinase AKT ou olaparibe ou um sal farmaceuticamente aceitável dos mesmos; e

tratamento padrão de terapia para o câncer a ser tratado.

[000310] Adequadamente, o tratamento padrão de terapia pode ser dosado de acordo com o regime de dosagem habitual, conforme entendido por aqueles versados na técnica.

[000311] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica que compreende um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável sal do mesmo em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima, em associação com um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[000312] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica que compreende Exemplo 3 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima em associação com um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[000313] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica que compreende Exemplo 3 ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em combinação com AZD5363, AZD8186 ou olaparibe (ou um sal farmaceuticamente aceitável de qualquer um dos mesmos) em associação com um diluente ou veículo farmaceuticamente aceitável.

[000314] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica que compreende um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo

em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima em associação com um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável para uso no tratamento de câncer.

[000315] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica que compreende Exemplo 3 ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima em associação com um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável para uso no tratamento de câncer.

[000316] De acordo com um aspecto adicional da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica que compreende Exemplo 3 ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo em combinação com AZD5363, AZD8186 ou olaparibe (ou um sal farmacêuticamente aceitável de qualquer um dos mesmos) em associação com um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável para uso no tratamento de câncer.

[000317] De acordo com uma outra característica da invenção, é proporcionado o uso de um 20 composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima, na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000318] De acordo com uma outra característica da invenção, é proporcionado o uso do Exemplo 3 ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000319] De acordo com uma outra característica da invenção, é proporcionado o uso do Exemplo 3 ou um sal farmacêuticamente acei-

tável do mesmo em combinação com AZD5363, AZD8186 ou olaparibe (ou um sal farmacêuticamente aceitável de qualquer um dos mesmos) na fabricação de um medicamento para uso no tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem.

[000320] Deste modo, em uma característica adicional da invenção, é proporcionado um método de tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento, que compreende administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima.

[000321] Deste modo, em uma característica adicional da invenção, é proporcionado um método de tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento que compreende administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz do Exemplo 3 ou um farmacêuticamente aceitável seu sal em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima.

[000322] Deste modo, em uma característica adicional da invenção, é proporcionado um método de tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem, que precisa de tal tratamento que compreende administração, ao dito animal, de uma quantidade eficaz do Exemplo 3 ou um farmacêuticamente aceitável seu sal em combinação com AZD5363, AZD8186 ou olaparibe (ou um sal farmacêuticamente aceitável de qualquer um dos mesmos).

[000323] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo em combinação com um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima.

[000324] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima em uma segunda forma de dosagem unitária; e

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem.

[000325] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um agente antitumor selecionado a partir de um listado em (i) - (xi) aqui acima, em uma segunda forma de dosagem unitária;

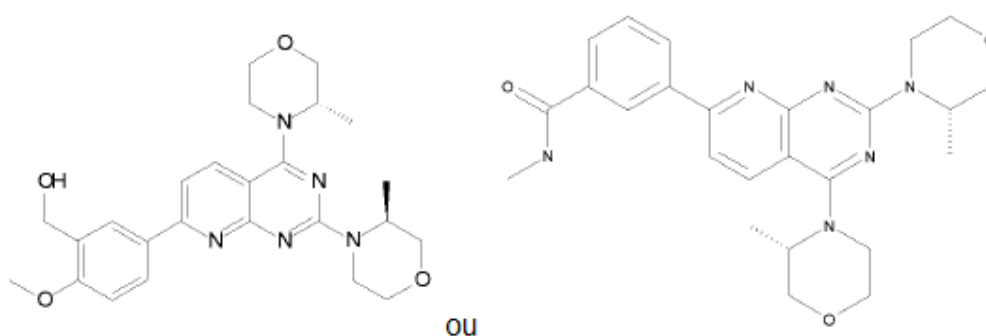
meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem; e, opcionalmente,

instruções de uso.

[000326] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de mTOR, tais como aqueles descritos no documento WO2008/023161, por exemplo:



[000327] em uma segunda forma de dosagem unitária; e

[000328] c) meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem.

[000329] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de PI3K- β , tal como qualquer um dos exemplos no Pedido de Patente Internacional WO2011/051704 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma segunda forma de dosagem unitária; e

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem.

[000330] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de PI3K- β , tal como qualquer um dos exemplos no Pedido de Patente Internacional WO2011/051704 ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma segunda forma de dosagem unitária;

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem; e, opcionalmente,

instruções de uso.

[000331] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de PI3K- β e PI3K- δ , o qual é 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenilamino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-6-carboxamida (Exemplo 3.06b no Pedido de Patente Internacional

WO2011/051704, também conhecido como AZD8186) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma segunda forma de dosagem unitária; e

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem.

[000332] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de PI3K- β e PI3K- δ , o qual é 8-((1R)-1-(3,5-difluorofenilamino)etil)-N,N-dimetil-2-morfolino-4-oxo-4H-cromeno-6-carboxamida (Exemplo 3.06b no Pedido de Patente Internacional WO2011/051704, também conhecido como AZD8186) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma segunda forma de dosagem unitária;

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem; e, opcionalmente,

instruções de uso.

[000333] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de quinase AKT, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxipropil)-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo (AZD5363, vide, por exemplo, documento WO2009/047563), em uma segunda forma de dosagem unitária;

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem; e, opcionalmente,

instruções de uso.

[000334] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de quinase AKT, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxiopropil)-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo (AZD5363, vide, por exemplo, documento WO2009/047563), em uma segunda forma de dosagem unitária; e

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem.

[000335] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

um inibidor de quinase AKT, tal como (S)-4-amino-N-(1-(4-clorofenil)-3-hidroxiopropil)-1-(7H-pirrolo[2,3-d]pirimidin-4-il)piperidina-4-carboxamida ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo (AZD5363, vide, por exemplo, documento WO2009/047563), em uma segunda forma de dosagem unitária;

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem; e, opcionalmente,

instruções de uso.

[000336] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

olaparibe (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-benzil]-2H-ftalazin-1-ona) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em uma segunda forma de dosagem unitária;

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem.

[000337] De acordo com outro aspecto da presente invenção, é proporcionado um kit compreendendo:

um composto de Fórmula (I) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo em uma primeira forma de dosagem unitária;

olaparibe (4-[3-(4-ciclopropanocarbonil-piperazina-1-carbonil)-4-fluoro-benzil]-2H-ftalazin-1-ona) ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, em uma segunda unidade forma de dosagem unitária;

meios recipientes para conter as ditas primeira e segunda formas de dosagem; e, opcionalmente,

instruções de uso.

[000338] Em todas as combinações, usos, métodos de tratamento e kits acima, AZD5363, AZD8186 e olaparibe podem estar na forma de bases livres ou na forma de um sal farmaceuticamente-aceitável. Consequentemente, em uma modalidade, AZD5363 está na forma de uma base livre; em outra modalidade, AZD5363 está na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Em uma outra modalidade, AZD8186 está na forma de uma base livre; em outra modalidade, AZD8186 está na forma de um sal farmaceuticamente aceitável. Em uma outra modalidade, olaparibe está na forma de uma base livre; em outra modalidade, olaparibe está na forma de um sal farmaceuticamente aceitável.

[000339] Embora os compostos da Fórmula (I) sejam primariamente valiosos como agentes terapêuticos para uso em animais de sangue quente (incluindo o homem), eles também são úteis sempre que é necessário inibir os efeitos de quinases PI3- α e - δ . Assim, eles são úteis como padrões farmacológicos para uso no desenvolvimento de novos testes biológicos e na pesquisa de novos agentes farmacológicos.

[000340] Aqui, onde o termo "combinação" é usado, deverá ser en-

tendido que este refere-se à administração simultânea, separada ou sequencial. Em um aspecto da invenção, "combinação" refere-se à administração simultânea. Em outro aspecto da invenção, "combinação" refere-se à administração separada. Em um aspecto adicional da invenção, "combinação" refere-se à administração sequencial. Quando a administração é sequencial ou separada, o retardo na administração do segundo componente não deverá ser tal a perder o efeito benéfico.

[000341] Em uma modalidade, o tratamento sequencial envolve administração de cada componente da combinação dentro de um período de 11 dias. Em outra modalidade, este período é de 10 dias. Em outra modalidade, este período é de 9 dias. Em outra modalidade, este período é de 8 dias. Em outra modalidade, este período é de 7 dias. Em uma outra modalidade, este é período de 6 dias. Em outra modalidade, este período é dentro de 5 dias. Em outra modalidade, este período é dentro de 4 dias. Em outra modalidade, este período é dentro de 3 dias. Em outra modalidade, este período é dentro de 2 dias. Em outra modalidade, este período é dentro de 24 horas. Em outra modalidade, este período é dentro de 12 horas.

[000342] Administração sequencial e coadministração são ambas exemplificadas aqui nos experimentos de combinação com o Exemplo 3 e AZD5363 no modelo BT474. Neste exemplo, a administração sequencial é ilustrada por dosagem de AZD5363 durante 2 dias, seguido por Exemplo 3 durante 2 dias, então, 3 dias sem nenhuma dose de um ou outro agente antes que o padrão seja repetido ("ciclo de dosagem"). A coadministração é ilustrada com um regime de dosagem no qual tanto AZD5363 quanto Exemplo 3 são dosados durante 2 dias, seguido por 5 dias sem nenhuma dose de qualquer um dos agentes. Nestes dois exemplos, a administração sequencial parece ser mais eficaz para causar regressão do tumor, o que ilustra a importância potencial de otimização do regime.

[000343] Outros regimes de codosagem potenciais incluem:

1) um ciclo de dosagem em que tanto AZD5363 quanto Exemplo 3 são dosados durante 2 dias, seguido por 3 dias sem nenhuma dose de um ou outro agente;

2) um ciclo de dosagem em que tanto AZD5363 quanto Exemplo 3 são dosados durante 3 dias, seguido por 4 dias sem nenhuma dose de um ou outro agente;

3) um ciclo de dosagem em que tanto AZD5363 quanto Exemplo 3 são dosados durante 4 dias, seguido por 3 dias sem nenhuma dose de um ou outro agente;

4) um ciclo de dosagem em que tanto AZD5363 quanto Exemplo 3 são dosados durante 5 dias, seguido por 2 dias sem nenhuma dose de qualquer um dos agentes;

5) um ciclo de dosagem em que AZD5363 e Exemplo 3 são dosados em dias alternados;

6) um ciclo de dosagem em que AZD5363 e Exemplo 3 são dosados a cada três dias;

7) um ciclo de dosagem em que AZD5363 e Exemplo 3 são dosados em um esquema semanal com 3 e 4 dias de intervalo entre as dosagens (por exemplo, segunda-feira/quinta-feira);

8) um ciclo de dosagem em que AZD5363 e Exemplo 3 são dosados em um esquema semanal com 2 e 3 dias lacunas entre as dosagens (por exemplo, segunda/quarta/sexta-feira).

[000344] As combinações de compostos da fórmula (I), particularmente no Exemplo 3, com um inibidor de mTOR, tal como AZD2014, ou um inibidor de PI3K- β (tal como o inibidor AZD8186) pode, adequadamente, ser administrado em esquema similar àqueles descritos acima para a combinação do Exemplo 3 e AZD5363.

[000345] Uma combinação de um composto de fórmula (I) e olaparibe pode ser dosada de acordo com um regime onde olaparibe é dosa-

do diariamente e o composto de fórmula (I) é dosado de acordo com um esquema de dosagem intermitente (tal como, por exemplo, 2 dias de dosagem, seguido por 3 a 5 dias sem nenhuma dose).

[000346] Cada um destes regimes de dosagem ilustrativos compreende um aspecto adicional da invenção. Cada um destes regimes de dosagem ilustrativos também pode ser aplicado a combinações com outros agentes antitumor listados em (i) a (xi) acima.

[000347] Pode ser vantajoso, dentro de um dado ciclo de dosagem, administrar um componente específico da combinação antes do outro - ou seja, dosagem sequencial.

[000348] Portanto, em uma modalidade, a administração sequencial compreende administração sequencial de um composto de fórmula (I) (particularmente o Exemplo 3) antes de administração do outro agente antitumor listado em (i) a (xi) acima, particularmente um agente anti-tumour selecionado de AZD5363, AZD8186 e olaparibe, dentro de um ciclo de dosagem.

[000349] Em outra modalidade, a administração sequencial compreende a administração sequencial do agente antitumor listado em (i) a (xi) acima, em particular um agente antitumor selecionado de AZD5363, AZD8186 e olaparibe, antes de administração do composto de fórmula (I) (particularmente o Exemplo 3) dentro de um ciclo de dosagem.

[000350] Em uma modalidade, o agente antitumor listado em (i) a (xi) acima e o composto de fórmula (I) são dosados até 2 dias de intervalo. Em uma outra modalidade, o agente antitumor listado em (i) a (xi) acima e o composto de fórmula (I) são dosados até 1 dia de intervalo. Em uma outra modalidade, o agente antitumor listado em (i) a (xi) acima e o composto de fórmula (I) são administrados até 18 horas de intervalo. Em uma outra modalidade, o agente antitumor listado em (i) a (xi) acima e o composto de fórmula (I) são administrados até 12 horas

de intervalo. Em uma outra modalidade, o agente antitumor listado em (i) a (xi) acima e o composto de fórmula (I) são dosados até 6 horas de intervalo. Em uma outra modalidade, o agente antitumor listados em (i) a (xi) acima e o composto de fórmula (I) são dosados até 3 horas de intervalo.

[000351] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 5 a 10 dias de duração.

[000352] De acordo com outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 6 a 10 dias de duração.

[000353] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 7 a 9 dias de duração.

[000354] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 6 a 8 dias de duração.

[000355] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 10 dias de duração.

[000356] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 9 dias de duração.

[000357] De acordo com outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 8 dias de duração.

[000358] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 7 dias de duração.

[000359] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 6 dias de duração.

[000360] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode ter de 5 dias de duração.

[000361] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode envolver o composto de fórmula (I) (particularmente no Exemplo 3) sendo dosado durante 2-4 dias consecutivos, não sendo dosado durante os outros dias de um ciclo de dosagem de 6 a 9 dias de duração.

[000362] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode envolver

o composto de fórmula (I) (particularmente no Exemplo 3) sendo dosado durante 3-4 dias consecutivos, não sendo dosado durante os outros dias dentro de um ciclo de dosagem de 6 a 9 dias de duração (por exemplo, 7 dias de duração).

[000363] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode envolver o composto de fórmula (I) (particularmente no Exemplo 3) sendo administrado durante 3-5 dias consecutivos e não sendo dosado durante os outros dias dentro de um ciclo de dosagem de 7 a 10 dias de duração.

[000364] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode envolver o composto de fórmula (I) (particularmente no Exemplo 3) sendo dosado durante 5 dias consecutivos, não sendo dosado durante os outros dias durante um ciclo de dosagem de 6 a 9 dias de duração.

[000365] De acordo com outras modalidades, o ciclo de dosagem pode envolver o composto de fórmula (I) (particularmente no Exemplo 3) sendo dosado durante 4 dias consecutivos e não sendo dosado durante os outros dias durante um ciclo de dosagem de 6 a 9 dias de duração (por exemplo, 7 dias de duração).

[000366] Em outras modalidades, o ciclo de dosagem pode envolver o composto de fórmula (I) (particularmente no Exemplo 3) sendo dosado durante 3 dias consecutivos, não sendo dosado durante os outros 15 dias dentro de um ciclo de dosagem de 6-9 dias de duração.

[000367] Os ciclos de dosagem podem ser separados por um número de dias em que nenhum dos componentes ativos da associação são administrados.

[000368] A terapia combinada, conforme descrito acima, pode ser adicionada ao tratamento de terapia padrão tipicamente realizado de acordo com o esquema de dosagem de prescrição habitual.

Assistência Médica Personalizada

[000369] Um outro aspecto da presente invenção se baseia na identi-

ficação de uma ligação entre o estado do gene que codifica a 3-quinase de fosfoinosítídeo, alfa polipeptídeo catalítico (PIK3CA), e a suscetibilidade ao tratamento com um composto de Fórmula (I). Isto, portanto, oferece oportunidades, métodos e ferramentas para selecionar pacientes para tratamento com um composto da Fórmula (I), particularmente pacientes com câncer, e/ou evitar o tratamento de pacientes com menos probabilidade de responder ao tratamento terapêutico, deste modo, evitando o tratamento desnecessário e quaisquer efeitos secundários que possam estar associados a tal tratamento ineficaz.

[000370] A presente invenção refere-se a ferramentas de seleção de pacientes e métodos (incluindo medicina personalizada). A seleção é baseada no fato se as células tumorais a serem tratadas possuem o gene de PIK3CA de tipo selvagem ou mutante. O estado do gene de PIK3CA, portanto, pode ser usado como um biomarcador de suscetibilidade ao tratamento com um inibidor de PI3K- α e $-\delta$.

[000371] Há uma clara necessidade de biomarcadores que enriquecerão ou selecionarão pacientes cujos tumores respondem ao tratamento com um inibidor de PI3K- α e $-\delta$, tal como um composto de Fórmula (I). Biomarcadores para seleção de pacientes que identificam os pacientes com maior probabilidade de responder a um agente são ideais para o tratamento de câncer, uma vez que eles reduzem o tratamento desnecessário de pacientes com tumores não responsivos em relação aos efeitos colaterais potenciais de tais agentes.

[000372] Um biomarcador pode ser descrito como "uma característica que é objetivamente medida e avaliada como um indicador de processos biológicos normais, processos patogênicos ou respostas farmacológicas a uma intervenção terapêutica". Um biomarcador é qualquer indicador identificável e mensurável associado a uma condição ou doença particular onde há uma correlação entre a presença ou nível do biomarcador e algum aspecto da condição ou doença (incluindo

a presença de, o nível ou nível de alteração, o tipo de, o estágio de, a suscetibilidade à condição ou doença ou a capacidade de resposta a um fármaco usado para tratamento da condição ou doença). A correlação pode ser qualitativa, quantitativa ou qualitativa e quantitativa. Tipicamente, um biomarcador é um composto, fragmento de composto ou grupo de compostos. Tais compostos podem ser encontrados em quaisquer compostos em ou produzidos por um organismo, incluindo proteínas e peptídeo(s), ácidos nucleicos e outros compostos.

[000373] Os biomarcadores podem ter um poder preditivo e, como tal, podem ser usados para prever ou detectar a presença, nível, tipo ou estágio de condições ou doenças particulares (incluindo a presença ou nível de micro-organismos ou toxinas particulares), a suscetibilidade (incluindo suscetibilidade genética) às condições ou doenças particulares ou a resposta aos tratamentos particulares (incluindo tratamentos com fármacos). Acredita-se que os biomarcadores desempenharão um papel cada vez mais importante no futuro da descoberta e desenvolvimento de medicamentos, melhorando a eficiência dos programas de investigação e desenvolvimento. Os biomarcadores podem ser usados como agentes de diagnóstico, monitores de progressão de doenças, monitores de tratamento e agentes de previsão de resultados clínicos. Por exemplo, vários projetos de pesquisa de biomarcadores estão tentando identificar marcadores de câncer específicos e de doenças cardiovasculares e imunológicas específicas. Acredita-se que o desenvolvimento de novos biomarcadores validados levará a uma redução significativa tanto dos custos com assistência médica quanto com o desenvolvimento de fármacos e a melhorias significativas no tratamento de uma ampla variedade de doenças e condições.

[000374] De modo a conceber de forma otimizada ensaios clínicos e obter o máximo de informações a partir destes ensaios, um biomarca-

dor pode ser necessário. O marcador pode ser mensurável em tecidos de tumor e substitutos. Idealmente, estes marcadores também se correlacionam com a eficácia e, portanto, poderiam, em ultimo caso, ser usados para seleção dos pacientes.

[000375] Assim, o problema técnico subjacente a este aspecto da presente invenção é a identificação de meios para estratificação de pacientes para tratamento com um composto de Fórmula (I). O problema técnico é resolvido pela disposição das modalidades caracterizadas nas reivindicações e/ou descrição.

[000376] Conforme detalhado nos exemplos aqui, descobriu-se que células as quais possuem uma mutação em PIK3CA são, em geral, mais suscetíveis à inibição de crescimento pelo composto de Fórmula (I).

[000377] A invenção proporciona um método para determinação da sensibilidade de células a um composto de Fórmula (I). O método compreende determinação do estado do gene de PIK3CA nas ditas células. As células são identificadas como provavelmente sensíveis a um composto de Fórmula I se as células possuem um gene de PIK3CA com mutação. Consequentemente, é previsto que os pacientes com um gene de PIK3CA com mutação são particularmente suscetíveis ao tratamento com um composto de Fórmula (I). Uma célula é definida como sensível a um composto de Fórmula (I) se ela inibe o aumento no número de células em um ensaio de crescimento celular (seja através de inibição da proliferação celular e/ou através de aumento da morte celular). Os métodos da invenção são úteis para prever quais células têm maior probabilidade de responder a um composto de Fórmula (I) ao inibir o crescimento.

[000378] A presente invenção se baseia ainda, em parte, em métodos que podem ser usados para determinar a resposta de um paciente a um composto de Fórmula (I), incluindo determinar se administrar um

composto de Fórmula (I). Especificamente, os métodos da presente invenção incluem determinação do estado do gene de PIK3CA. A presença de um gene de PIK3CA com mutação indica que células tumorais são mais propensas a responder à inibição de crescimento quando contactadas com um composto de Fórmula (I). O estado do gene de PIK3CA pode, conseqüentemente, ser usado para selecionar pacientes para tratamento com um composto de Fórmula (I).

[000379] Além disso, um método *in vitro* para a identificação de um paciente provavelmente sensível a um composto de Fórmula (I) é descrito. Também são descritos usos de iniciadores ou sondas de oligo- ou polinucleotídeo capazes de detectar o estado de mutação do gene de PIK3CA. Também é descrito o uso de kits para detecção de mutações em PIK3CA incluindo, porém sem limitações, kits de detecção de mutações em PIK3CA comercializados por empresas de diagnóstico, incluindo Qiagen e Roche Molecular Systems. Em uma outra modalidade, a invenção refere-se a um método *in vitro* para determinar se é provável que um paciente que está sofrendo de câncer seja um respondedor ao tratamento com um composto de Fórmula (I), o dito método compreendendo as etapas de: (i) obtenção de uma amostra representativa do tumor que foi previamente coletada do dito paciente; e (ii) determinar se os genes de PIK3CA contêm uma mutação na dita amostra. Uma mutação no gene de PIK3CA 5 indicativa de uma maior probabilidade de resposta ao tratamento com um composto de Fórmula (I). Como um teste de biomarcador gênico único, a identificação de tumores que contêm uma mutação em PIK3CA enriquecerá a resposta a um composto de Fórmula (I). Tumores individuais que contêm uma mutação em PIK3CA têm uma maior probabilidade de responder a um composto de Fórmula (I).

[000380] Uma amostra "representativa do tumor" pode ser a amostra de tumor real isolada ou pode ser uma amostra que tenha sido ainda

processada, por exemplo, uma amostra de ácido nucleico amplificada por PCR a partir da amostra de tumor.

Definições:

[000381] Nesta seção de Assistência Médica Personalizada:

[000382] "Alelo" refere-se a uma forma particular de um *locus* genético que se distingue de outras formas pela sua sequência de nucleotídeos ou aminoácidos em particular.

[000383] "Reações de amplificação" são reações de ácidos nucleicos as quais resultam em amplificação específica de ácidos nucleicos alvo em relação a ácidos nucleicos não alvo. A reação em cadeia de polimerase (**P**olymerase **C**hain **R**eaction - PCR) é uma reação de amplificação bem conhecida.

[000384] "Câncer" é aqui usado para se referir ao crescimento celular neoplásico resultante da transformação em um fenótipo neoplásico. Essa transformação celular frequentemente envolve mutação genética.

[000385] "Gene" é um segmento de DNA que contém todas as informações para a biossíntese regulada de um produto de RNA, incluindo um promotor, éxons, íntrons e outros elementos de sequência os quais podem estar localizados em regiões de flanqueamento 5' ou 3' (não dentro das porções transcritas do gene) que controlam a expressão.

[000386] "Estado do gene" refere-se ao fato se o gene é ou não de tipo selvagem (isto é, mutante).

[000387] "Marcador" refere-se a uma composição capaz de produzir um sinal detectável indicativo da presença do polinucleotídeo alvo em uma amostra de teste. Marcadores adequados incluem radioisótopos, cromóforos, nucleotídeos, enzimas, substratos, moléculas fluorescentes, porções quimioluminescentes, partículas magnéticas, unidades bioluminescentes e assim por diante. Como tal, um marcador é qualquer composição detectável por meios espectroscópicos, fotoquimi-

cos, bioquímicos, imunoquímicos, elétricos, ópticos ou químicos.

[000388] "Variações não sinônimas" refere-se a uma variação (desvio) em ou sobreposição da sequência de codificação de um gene que resulta na produção de uma sequência polipeptídica distinta (alterada). Estas variações podem ou não afetar a função da proteína e incluem variantes no sentido errôneo (resultando em substituição de um aminoácido por outro), variantes sem senso (resultando em um polipeptídeo truncado em virtude da geração de um códon de término prematuro) e variantes de inserção/eliminação.

[000389] "Variação sinônima" refere-se a uma variação (desvio) na sequência de codificação de um gene que não afeta sequência polipeptídica codificada. Estas variações podem afetar indiretamente a função da proteína (por exemplo, ao alterar a expressão do gene), mas, na ausência de evidência do contrário, são geralmente aceitas como inócuas.

[000390] "Ácido nucleico" refere-se a moléculas de DNA e RNA fita simples ou dupla, incluindo ácidos nucleicos naturais encontrados na natureza e/ou ácidos nucleicos modificados tendo esqueletos ou bases modificadas, conforme conhecido na técnica.

[000391] "Iniciador" refere-se a uma sequência de oligonucleotídeos de DNA fita simples capaz de atuar como um ponto de iniciação para a síntese de um produto de extensão do iniciador que é complementar à fita de ácido nucleico a ser copiado. O comprimento e a sequência do iniciador deverão ser tais que sejam capazes de iniciar a síntese de produtos de extensão. Um iniciador típico contém pelo menos cerca de 7 nucleotídeos de comprimento de uma sequência substancialmente complementar à sequência alvo, mas iniciadores um pouco mais longos são preferidos. Normalmente, os iniciadores contêm cerca de 15-26 nucleotídeos, mas iniciadores mais longos ou mais curtos também podem ser empregados.

[000392] "Sítio polimórfico" é uma posição dentro de um *locus* no qual pelo menos duas sequências alternativas são encontradas em uma população.

[000393] "Polimorfismo" refere-se à variação na sequência observada em um indivíduo em um sítio polimórfico. Os polimorfismos incluem substituições, inserções, eliminações e microssatélites de nucleotídeos e pode, mas não necessariamente, resultar em diferenças detectáveis na expressão gênica ou função da proteína. Na ausência de evidência de um efeito sobre a expressão ou função de proteínas, polimorfismos comuns, incluindo variantes não sinônimas, são geralmente considerados como estando incluídos na definição de sequência do gene de tipo selvagem. Um catálogo de polimorfismos humanos e anotação associada, incluindo validação, frequências observadas e associação com doenças, é mantido pelo NCBI (dbSNP: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projetos/SNP/>). Por favor note que o termo "polimorfismo", quando usado no contexto de sequências gênicas, não deverá ser confundido com o termo "polimorfismo" quando usado no contexto da forma no estado sólido de um composto, que é a natureza cristalina ou amorfa de um composto. Aqueles versados na técnica entenderão o significado pretendido por seu contexto.

[000394] "Sonda" refere-se a oligonucleotídeos específicos para sequências fita simples que têm uma sequência que é exatamente complementar à sequência alvo do alelo a ser detectado.

[000395] "Resposta" é definida por medições feitas de acordo com Response Evaluation Criteria in Solid Tumours (RECIST) que envolve a classificação dos pacientes em dois grupos principais: aqueles que mostram uma resposta parcial ou doença estável e aqueles que mostram sinais de doença progressiva.

[000396] "Condições de hibridização rigorosas" refere-se a uma incubação durante a noite a 42°C em uma solução compreendendo for-

mamida a 50%, 5x SSC (NaCl a 750 mM, citrato trissódico a 75 mM), fosfato de sódio a 50 mM (pH de 7,6), 5x solução de Denhardt, sulfato de dextrana a 10% e 20 pg/ml de DNA de esperma de salmão desnaturado cortado, seguido por lavagem dos filtros em 0,1X SSC a cerca de 65°C.

[000397] "Sobrevida" abrange a sobrevida global dos pacientes, bem como a sobrevida sem progressão.

[000398] "Sobrevida global" (**O**verall **S**urvival - OS) é definida como o tempo desde o início da administração de fármaco até morte de qualquer causa. "Sobrevida sem progressão" (**P**rogression-**F**ree **S**urvival - PFS) é definida como o tempo desde o início da administração de fármaco até o primeiro aparecimento de progressão da doença ou morte em virtude de qualquer causa.

[000399] De acordo com um aspecto da invenção, é proporcionado um método para seleção de um paciente para tratamento com um composto de Fórmula (I), o método compreendendo fornecimento de uma amostra contendo células tumorais de um paciente; determinar se o gene de PIK3CA na amostra que contém as células tumorais do paciente é de tipo selvagem ou mutante; e seleção de um paciente para tratamento com um composto de Fórmula (I) com base na mesma.

[000400] O método pode incluir ou excluir a etapa real de isolamento da amostra do paciente. Assim, de acordo com um aspecto da invenção, é proporcionado um método para seleção de um paciente para tratamento com um composto de Fórmula (I), o método compreendendo determinar se o gene de PIK3CA em uma amostra contendo células tumorais previamente isolada do paciente é de tipo selvagem ou mutante; e seleção de um paciente para tratamento com um composto de Fórmula (I) com base na mesma.

[000401] Em uma modalidade, o paciente é selecionado para tratamento com um composto de Fórmula (I) se o DNA da célula tumoral

tem um gene de PIK3CA mutante. Em outras modalidades, um paciente cujo DNA das células tumorais possui um gene de PIK3CA de tipo selvagem não é selecionado para tratamento com um composto de Fórmula (I).

[000402] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um método para prever a resposta do paciente a um composto de Fórmula (I), o método compreendendo determinar se o gene de PIK3CA em células tumorais do paciente é de tipo selvagem ou mutante e, com base nisto, prever a capacidade de resposta de um paciente ao tratamento com um composto de Fórmula (I).

[000403] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um método para determinar a probabilidade de eficácia do tratamento com um composto de Fórmula (I) em um paciente humano afetado com câncer compreendendo: determinar se o(s) gene(s) de PIK3CA em células tumorais do paciente é de tipo selvagem ou mutante e, com base nisto, prever a capacidade de resposta de um paciente ao tratamento com um composto de Fórmula (I).

[000404] Para fins da presente invenção, um estado do gene de tipo selvagem se destina a indicar expressão normal ou adequada do gene e função normal da proteína codificada. Em contraste, o estado mutante se destina a indicar expressão anormal ou inapropriada do gene ou expressão de uma proteína com função alterada, consistente com os papéis conhecidos de PIK3CA mutante em câncer (conforme descrito aqui). Qualquer número de alterações genéticas ou epigenéticas incluindo, porém sem limitações, mutação, amplificação, eliminação, rearranjo genômico ou alterações no perfil de metilação, podem resultar em um estado mutante. No entanto, se tais alterações resultam em expressão apropriada da proteína normal ou uma variante funcionalmente equivalente, então, o estado do gene é considerado como de tipo selvagem. Exemplos de variantes que normalmente não resultari-

am em um estado de gene mutante funcional incluem variantes de codificação sinônimas e polimorfismos comuns (sinônimos ou não sinônimos). Conforme discutido abaixo, o estado do gene pode ser avaliado por meio de um ensaio funcional ou pode ser inferido a partir da natureza dos desvios detectados em relação a uma sequência de referência.

[000405] Em determinadas modalidades, o estado de tipo selvagem ou mutante do gene de PIK3CA é determinado pela presença ou ausência de variações de ácidos nucleicos não sinônimas nos genes. Variações não sinônimas observadas que correspondem a polimorfismos comuns conhecidos sem efeitos funcionais anotados não contribuem para um estado de gene mutante.

[000406] Outras variações no gene de PIK3CA que significam um estado mutante incluem variações em sítios de *splicing* que diminuem o reconhecimento de uma junção de íntron/éxon durante o processamento de pré-mRNA em mRNA. Isto pode resultar em salto de um éxon ou na inclusão da sequência normalmente intrônica em *splicing* de mRNA (retenção de íntron ou uso de junções de *splicing* críptica). Isto pode, por sua vez, resultar na produção de proteína aberrante com inserções e/ou eliminações em relação à proteína normal. Assim, em outras modalidades, o gene tem um estado mutante se há uma variante que altera a sequência de reconhecimento de sítio de *splicing* em uma junção de íntron/éxon.

[000407] Além disso, a medição do estado de mutação ou estado de ativação de genes adicionais, tal como Kras, um marcador potencial de resistência em tumores com PIK3CA ou PI3K- α aberrante ou desregulada, poderia ajudar a aumentar a previsibilidade de uma abordagem da medicina personalizada.

[000408] Em uma pesquisa que foi realizada na AstraZeneca em cânceres de mama (com base no banco de dados COSMIC (Welcome

Trust Sanger Institute, Setembro de 2011), > 55 mutações diferentes no gene de PIK3CA foram identificadas através de cruzamento com um conjunto de dados que abrangia > 5K de tumores humanos. A maioria das mutações ocorreram em uma frequência <1%, 3 ocorreram em uma frequência de 1-3%, mas quatro mutações respondiam por ~88% do total de mutações em PIK3CA. Estas eram mutações no sentido errôneo de domínio de quinase no domínio de quinase C-terminal, H1047R (55%) e H1047L (5%), e nos resíduos de domínio helicoidal, E545K (18%) e E542K (11%). Uma longa lista de outras mutações prevalentes em câncer de mama, ainda que não seja exaustiva, abrange R38H, R38C, R88Q, N345K, C420R, E453Q, P539R, E542K, E545K, E545A, Q546K, Q546P, M1043I, M1043V, H1047R, H1047L, H1047Y. Consequentemente, podem ser construídos ensaios diagnósticos que focam sobre a detecção das mutações mais comuns, deste modo, permitindo a identificação da maioria das mutações em PIK3CA. Por exemplo, o Cobas(TM) PIK3CA Mutation Test from Roche Molecular Systems é concebido para detectar 17 mutações nos éxons 1, 4, 7, 9 e 20 do gene de PIK3CA (E542K, E545A, E545G, E545K, E545D, Q546K, Q546R, Q546E, Q546L, N345K, C420R, R88Q, H1047L, H1047R, H1047Y, G1049R e M1043I) no DNA isolado a partir de amostras de tumores incrustadas em parafina fixadas em formalina. Este kit é capaz de captar até ~95% das mutações em câncer de mama ER+ve. A distribuição de mutações difere entre outros tipos de tumores e a estratégia de diagnóstico pode ser adaptada de acordo. Por exemplo, em câncer do endométrio, há uma distribuição mais uniforme de mutações espalhadas por toda a sequência de codificação do gene de PIK3CA e um maior número de mutações na região N-terminal da proteína (comunicado por Douglas A. Levine, M.D., TCGA 2º Annual Symposium, 28 de Novembro de 2012), em comparação com cânceres de mama.

[000409] Para PIK3CA, sequências de referência estão disponíveis para o gene (número de acesso GenBank: NG_012113), mRNA (número de acesso GenBank: NM_006218) e proteína (número de acesso GenBank: NP006209 ou acesso Swiss-Prot: P42336). As sequências gênicas de referência (região genômica) incluem 5000 bases de sequência a montante e 2000 bases de sequência a jusante. As mutações dentro do PIK3CA são bem conhecidas (banco de dados COSMIC - Welcome Trust Sanger Institute) e aqueles versados na técnica serão capazes de determinar o estado do gene de PIK3CA, ou seja, se um gene de PIK3CA em particular é de tipo selvagem ou mutante, com base na comparação de sequência de DNA ou proteína com o tipo selvagem.

[000410] Será evidente que o gene e as sequências de mRNA descritas para PIK3CA e a subunidade catalítica P110a da sequência de proteína de alfa quinases PI3 são, cada um, uma sequência representativa. Em indivíduos normais, há duas cópias de cada gene, uma cópia materna e uma paterna, as quais provavelmente terão algumas diferenças quanto à sequência. Além disso, dentro de uma população existirão numerosas variantes alélicas da sequência gênica. Outras sequências consideradas tipo selvagem incluem aquelas as quais possuem uma ou mais alterações sinônimas na sequência de ácido nucleico (alterações as quais não alteram a sequência da proteína codificada), polimorfismos comuns não sinônimos (por exemplo, polimorfismos de linhagem germinativa) que alteram a sequência da proteína, mas não afetam a função da proteína, e alterações de sequência em sítio de *splicing* e intrônicas.

[000411] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um método para determinação da probabilidade de eficácia do tratamento com um composto de Fórmula (I) em um paciente humano afetado com câncer compreendendo: detecção da presença ou ausência

de pelo menos uma variação não sinônima de ácido nucleico no gene de PIK3CA do dito paciente em relação ao gene do tipo selvagem, em que a presença de pelo menos uma variação somática não sinônima de ácido nucleico no gene de PIK3CA indica que é provável que o tratamento com o composto de Fórmula (I) seja eficaz.

[000412] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um método para avaliar a suscetibilidade de um indivíduo ao tratamento com um composto de Fórmula (I), método o qual compreende:

determinação do estado de mutação não sinônima do gene de PIK3CA em DNA de células tumorais do indivíduo; e

(ii) determinação da suscetibilidade do indivíduo suscetível ao tratamento com um composto de Fórmula (I) em função do estado de mutação não sinônima do gene de PIK3CA nas células tumorais.

[000413] Há inúmeros métodos disponíveis para aqueles versados na técnica para determinar o estado do gene de PIK3CA. O estado do gene pode ser determinado ao determinar a sequência de ácido nucleico. Isto poderia ser feito através de sequenciamento direto do gene de comprimento completo ou análise de sítios específicos dentro do gene, por exemplo, sítios comumente com mutação.

[000414] Um meio alternativo para determinar se o gene de PIK3CA é de tipo selvagem ou mutante ou não é avaliar a função do gene transcrito. Mutação funcional deste gene de PIK3CA produz uma proteína que tem maior atividade de quinase de lipídios, resultando em aumento de sinalização a jusante da via em células incluindo, porém sem limitações, a ativação de quinases Akt e S6. Ensaios para avaliar o estado funcional das variantes de PIK3CA, quando expressa em células incluem, porém sem limitações:

(i) produção aumentada do produto da atividade de quinase do gene de PIK3CA, fosfatidilinositol-trifosfato (PI(3,4,5)P3);

(ii) aumento dos níveis de quinase Akt ou S6 fosforilada;

(iii) aumento do foco e formação de colônias de células NIH-3T3 transfectadas com a variante de PIK3CA; (Ikenoue T. *et al.*, Cancer Res. 65, 2005, 4562-4567).

Amostras

[000415] A amostra do paciente a ser testada quanto ao estado do gene pode ser qualquer tecido de tumor ou células tumorais contendo a amostra obtida ou obtidas a partir do indivíduo. A amostra de teste é, convenientemente, uma amostra de sangue, esfregaço bucal, biópsia ou outro fluido corporal ou tecido obtido de um indivíduo. Exemplos particulares incluem: células tumorais em circulação, DNA em circulação no plasma ou soro, células isoladas a partir do fluido ascítico de pacientes com câncer de ovário, expectoração pulmonar de pacientes com tumores de pulmão, um aspirado de agulha fina de um paciente com câncer de mama, urina, sangue periférico, uma raspagem de células, um folículo de cabelo, um pedaço de pele ou uma amostra bucal.

[000416] Será apreciado que a amostra de teste pode ser igualmente uma sequência de ácido nucleico que corresponde à sequência na amostra de teste, isto é, a totalidade ou uma parte da região do ácido nucleico na amostra pode ser primeiro amplificada usando qualquer técnica conveniente, por exemplo, reação em cadeia de polimerase (**P**olymerase **C**hain **R**eaction - PCR), antes de análise. O ácido nucleico pode ser DNA genômico ou RNA celular fracionado ou inteiro. Em modalidades particulares, o RNA é RNA celular inteiro e é usado diretamente como matriz para marcação de uma primeira fita de cDNA usando iniciadores aleatórios ou iniciadores poli A. O ácido nucleico ou proteína na amostra de teste pode ser extraída a partir da amostra de acordo com metodologias convencionais (vide Green & Sambrook, Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4ª edição, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY). Os métodos diagnósticos da invenção po-

dem ser realizados usando uma amostra previamente retirada do paciente ou indivíduo. Tais amostras podem ser conservadas por meio de congelamento ou fixadas e incluídas em formol-parafina ou outros meios. Alternativamente, uma amostra contendo célula tumoral fresca pode ser obtida e usada.

[000417] Os métodos da invenção podem ser aplicados usando as células de qualquer tumor. Tumores adequados para o tratamento com um composto de Fórmula (I) foram descritos aqui antes.

[000418] Mutações em PIK3CA são amplamente encontradas em tumores clínicos, mas a prevalência de mutações em cada um dos genes varia significativamente pelo tipo de tecido tumoral. Por exemplo, mutações em PIK3CA são relativamente comuns em câncer de mama, mas relativamente raras em tumores renais.

Tabela 1

Tecido	Prevalência de mutação em PIK3CA (%)
Pênis	29
Endométrio	26
Mama	26
Intestino delgado	20
Trato urinário	17
Pele	13
Intestino grosso	12
Estômago	9
Trato biliar	9
Ovário	9
Nuca	8

Tecido	Prevalência de mutação em PIK3CA (%)
Esôfago	6
Fígado	6
Trato aerodigestivo superior	6
SNC	5
NS	5
Pulmão	4
Tiroide	4
Pituitária	3
Tecido mole	3
Pâncreas	3
Rim	2
Próstata	2
Meninges	1
Olho	1
Gânglios autonômicos	1
Hematopoiético/linfoide	1
Glândula adrenal	0
Ossos	0
Trompas de Falópio	0
Trato gastrointestinal (local indeterminado)	0

Tecido	Prevalência de mutação em PIK3CA (%)
Peritônio	0
Glândula salivar	0
Testículo	0
Timo	0
Vagina	0

[000419] Tabela 1: Prevalência de mutações em PIK3CA em amostras clínicas. Fonte de informação sobre PIK3CA é o banco de dados COSMIC (release v62). Os métodos de seleção de pacientes da invenção podem ser particularmente úteis nos segmentos de doença (tecido) onde há uma incidência elevada de mutações em PIK3CA (por exemplo, câncer de mama, trato urinário, endométrio, intestino grosso, colo do útero, etc.).

[000420] Conforme será evidente para aqueles versados na técnica, estes dados de frequência estão sendo continuamente refinados e atualizados à medida que dados novos e mais abrangentes emergem a partir do consórcio Human Cancer Genome Profiling, tal como o TCGA (The Cancer Genome Atlas) e ICGC (Cancer Genome International Consortium). Consequentemente, tipos de tumores com dependência de PIK3CA adicionais podem ser identificados e serem elegíveis para tratamento com os compostos descritos aqui.

Métodos para Detecção de Ácidos Nucleicos

[000421] A detecção de ácidos nucleicos de PIK3CA mutantes pode ser empregada, no âmbito da presente invenção, para prever a resposta ao tratamento medicamentoso. Uma vez que mutações nestes genes ocorrem ao nível do DNA, os métodos da invenção podem ser baseados na detecção de mutações ou variações no DNA genômico, bem como transcritos e proteínas em si. Isto pode ser desejável para

confirmar as mutações no DNA genômico por meio de análise de transcritos e/ou polipeptídeos, de modo a assegurar que a mutação detectada é, de fato, expressa no indivíduo.

[000422] Será evidente para aqueles versados na técnica que há um grande número de processos de análise que podem ser usados para detectar a presença ou ausência de nucleotídeos variantes em uma ou mais posições em um gene. Em geral, a detecção de uma variação alélica requer uma técnica de discriminação de mutação, opcionalmente uma reação de amplificação (tal como uma com base em reação em cadeia de polimerase) e, opcionalmente, um sistema de geração de sinal. Há uma multiplicidade de métodos de detecção de mutações disponíveis na técnica e estes podem ser usados em combinação com um sistema de geração de sinal, dos quais há numerosos disponíveis na técnica. Muitos métodos para detecção de variação alélica são revistos por Nollau *et al.*, Clin. Chem., 1997, 43, 1114-1120; Anderson S.M. Expert Rev Mol Diagn. 2011, 11, 635-642; Meyerson M. *et al.*, Nat Rev Genet., 2010, 685-696; e em livros texto padrões, por exemplo, "Laboratory Protocols for Mutation Detection", Ed. por U. Landegren, Oxford University Press, 1996 e "PCR", 2ª Edição por Newton & Graham, BIOS Scientific Publishers Limited, 1997.

[000423] Conforme observado acima, a determinação da presença ou ausência de uma variação especial ou pluralidade de variâncias no gene de PIK3CA em um paciente com câncer pode ser realizada através de uma variedade de maneiras. Tais testes são comumente realizados usando DNA ou RNA a partir de amostras biológicas coletadas, por exemplo, biópsias de tecidos, urina, fezes, expectoração, sangue, células, raspagens de tecido, aspirados da mama ou outros materiais celulares, e pode ser realizada através de uma variedade de métodos incluindo, porém sem limitações, PCR, hibridização com sondas específicas para alelo, detecção enzimática de mutação, clivagem química

de desemparelhamentos, espectrometria de massa ou sequenciamento de DNA, incluindo minissequenciamento.

[000424] Técnicas de detecção de mutação adequadas incluem o Amplification Refractory Mutation System (ARMS™), Amplification Refractory Mutation System Linear Extension (ALEX™), Competitive Oligonucleotide Priming System (COPS), Taqman, Beacons Moleculares, restriction fragment length polymorphism (RFLP) e PCR com base em sítio de restrição e técnicas de transferência de energia de ressonância de fluorescência (**F**luorescence **R**esonance **E**nergy **T**ransfer - FRET).

[000425] Em modalidades particulares, o método usado para determinação de nucleotídeo(s) dentro de um gene biomarcador é selecionado dentre: amplificação específica para alelo (PCR alelo-específica) - tal como o Amplification Refractory Mutation System (ARMS), sequenciamento, ensaio de discriminação alélica, hibridização, polimorfismo de comprimento de fragmento de restrição (**R**estriction **F**ragment **L**ength **P**olymorphism - RFLP) ou um ensaio de ligação de oligonucleotídeos (**O**ligonucleotide **L**igation **A**ssay - OLA).

[000426] Em modalidades particulares, a hibridização com sondas específicas para alelos pode ser realizada por: (1) oligonucleotídeos específicos para o alelo ligados a uma fase sólida (por exemplo, vidro, silício, membranas de náilon) com a amostra marcada em solução, por exemplo, como em muitas aplicações de chip de DNA; ou (2) amostra ligada (frequentemente DNA clonado ou DNA amplificado por PCR) e oligonucleotídeos marcados em solução (específicos para alelo ou curtos, de modo a permitir sequenciamento por hibridização). Testes diagnósticos podem envolver um painel de variâncias, muitas vezes sobre um suporte sólido, que permite a determinação simultânea de mais de uma variância. Tais sondas de hibridização são bem conhecidas na técnica (vide, por exemplo, Green & Sambrook, Eds., Molecular Clo-

ning: A Laboratory Manual, (2012, 4ª edição, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) e podem abranger dois ou mais sítios de variação.

[000427] Assim, em uma modalidade, a detecção da presença ou ausência de pelo menos uma mutação requer contato do ácido nucleico de PIK3CA contendo um sítio de mutação putativo com pelo menos uma sonda de ácido nucleico. A sonda hibridiza preferencialmente com uma sequência de ácido nucleico que inclui um sítio de variância e contém bases de nucleotídeos complementares no sítio de variância sob condições de hibridização seletivas. A hibridização pode ser detectada com um marcador detectável usando marcadores conhecidos por aqueles versados na técnica. Tais marcadores incluem, porém sem limitações, marcadores radioativos, fluorescentes, corantes e enzimáticos.

[000428] Em outra modalidade, a detecção da presença ou ausência de pelo menos uma mutação requer contato do ácido nucleico de PIK3CA contendo um sítio de mutação putativo com pelo menos um iniciador de ácido nucleico. O iniciador hibridiza preferencialmente a uma sequência de ácido nucleico que inclui um sítio de variância e contém bases de nucleotídeos complementares ao sítio de variância sob condições de hibridização seletivas.

[000429] Os oligonucleotídeos usados como iniciadores para amplificação específica podem trazer a base de nucleotídeo complementar à mutação de interesse no centro da molécula (de modo que a amplificação dependa de hibridização diferencial; vide, por exemplo, Gibbs *et al.*, 1989, Nucl. Acids Res., 17, 2437-248) ou na extremidade 3'-terminal de um iniciador onde, sob condições apropriadas, incompatibilidade pode impedir ou reduzir a extensão de polimerase (vide, por exemplo, Prossner, 1993, Tibtech. 11 238).

[000430] Em ainda outra modalidade, a detecção da presença ou ausência de pelo menos uma mutação compreende sequenciamento

de pelo menos uma sequência de ácido nucleico e comparação da sequência obtida com a sequência de ácido nucleico de tipo selvagem conhecida.

[000431] Alternativamente, a presença ou ausência de pelo menos uma mutação compreende determinação, por espectrometria de massa, de pelo menos uma sequência de ácido nucleico.

[000432] Em uma modalidade, a detecção da presença ou ausência de pelo menos uma variância de ácido nucleico compreende a realização de uma reação em cadeia de polimerase (**Polymerase Chain Reaction - PCR**). A sequência de ácido nucleico alvo que contém a variação hipotética é amplificada e a sequência de nucleotídeos do ácido nucleico amplificado é determinada. Determinação da sequência de nucleotídeos do ácido nucleico amplificado compreende sequenciamento de pelo menos um segmento de ácido nucleico. Alternativamente, os produtos da amplificação podem ser analisados usando qualquer método capaz de separar os produtos da amplificação de acordo com seu tamanho, incluindo eletroforese em gel automatizada e manual e assim por diante.

[000433] Mutações no ácido nucleico genômico são, vantajosamente, detectadas por meio de técnicas com base em desvio de mobilidade em fragmentos de ácido nucleico amplificados. Por exemplo, Chen *et al.*, *Anal Biochem* 1996, 239, 61-9, descrevem a detecção de mutações de bases simples através de um teste de desvio de mobilidade competitivo. Além disso, ensaios com base na técnica de Marcelino *et al.*, *BioTechniques* 1999, 26, 1134-1148, estão comercialmente disponíveis.

[000434] Em um exemplo particular, análise heteroduplex capilar pode ser usada para detectar a presença de mutações com base em desvio de mobilidade de ácidos nucleicos duplex em sistemas capilares como um resultado da presença de desemparelhamentos.

[000435] A geração de ácidos nucleicos para análise de amostras geralmente requer amplificação de ácidos nucleicos. Muitos métodos de amplificação contam com uma reação em cadeia enzimática (tal como uma reação em cadeia de polimerase, reação em cadeia de ligase ou uma replicação de sequência autossustentada) ou replicação de todo ou parte do vetor no qual ela tenha sido clonada. De preferência, a amplificação de acordo com a invenção é uma amplificação exponencial conforme demonstrado, por exemplo, pela reação em cadeia de polimerase.

[000436] Muitos métodos de amplificação de sinal e alvo foram descritos na literatura, por exemplo, revisões gerais destes métodos em Landegren U. *et. al.*, Science, 1988 242, 229-237 e Lewis R., Genetic Engineering News 1990, 10, 54-55. Estes métodos de amplificação podem ser usados nos métodos da presente invenção e incluem reação em cadeia de polimerase (**P**olymerase **C**hain **R**eaction - PCR), PCR *in situ*, reação de amplificação de ligase (**L**igase **A**mplification **R**eaction - LAR), hibridização de ligase, replicase QP de bacteriófago, sistema de amplificação com base em transcrição (**T**ranscription-based **A**mplification **S**ystem - TAS), amplificação genômica com sequenciamento de transcrito (**G**enomic **A**mplification with **T**ranscript **S**equencing - GAWTS), amplificação com base em sequência de ácido nucleico (**N**ucleic **A**cid **S**equencing-**B**ased **A**mplification - NASBA) e hibridização *in situ*. Iniciadores adequados para uso em várias técnicas de amplificação podem ser preparados de acordo com métodos conhecidos na técnica.

[000437] Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) é um método de amplificação de ácido nucleico descrito, *inter alia*, nas Patentes dos Estados Unidos N^{os} 4.683.195 e 4.683.202. PCR consiste em ciclos repetidos de reações de extensão do iniciador gerado com DNA polimerase. O DNA alvo é termicamente desnaturado e dois oligonucleotí-

deos, os quais abrangem a sequência alvo em fitas opostas do DNA a ser amplificado, são hibridizadas. Estes oligonucleotídeo se tornam iniciadores para uso com DNA polimerase. O DNA é copiado por extensão do iniciador para fazer uma segunda cópia de ambas as fitas. Ao repetir o ciclo de desnaturação térmica, hibridização de iniciadores e extensão, o DNA alvo pode ser amplificado um milhão de vezes ou mais, em cerca de duas a quatro horas. A PCR é uma ferramenta de biologia molecular que deve ser usada em conjunto com uma técnica de detecção para determinar os resultados da amplificação. Uma vantagem da PCR é que ela aumenta a sensibilidade ao amplificar a quantidade de DNA alvo em 1 milhão a 1 bilhão de vezes em aproximadamente 4 horas. A PCR pode ser usada para amplificar qualquer ácido nucleico conhecido em um contexto de diagnóstico (Mok *et al.*, Gynaecologic Oncology, 1994, 52: 247-252).

[000438] Uma técnica de amplificação específica para alelo, tal como o amplification Refractory Mutation System (ARMS™) (Newton *et al.*, Nucleic Acids Res., 1989, 17, 2503-2516, também pode ser usada para detectar mutações de uma única base. Sob as condições apropriadas de amplificação por PCR, um único desemparelhamento de base localizado na extremidade 3' do iniciador é suficiente para amplificação preferencial do alelo perfeitamente emparelhado (Newton *et al.*, 1989, *supra*), permitindo a discriminação de espécies estreitamente relacionadas. A base de um sistema de amplificação que usa os iniciadores descritos acima é que os oligonucleotídeos com um resíduo 3' não correspondente não funcionarão como iniciadores na PCR sob as condições apropriadas. Este sistema de amplificação permite a genotipagem unicamente por inspeção das misturas de reação em gel de agarose após eletroforese.

[000439] Análise dos produtos de amplificação pode ser realizada usando qualquer método capaz de separar os produtos de amplifica-

ção de acordo com seu tamanho, incluindo eletroforese em gel automatizada e manual, espectrometria de massa e assim por diante.

[000440] Os métodos de isolamento, amplificação e análise de ácido nucleico são rotina para aqueles versados na técnica e exemplos de protocolos podem ser encontrados, por exemplo, em Green & Sambrook, Eds., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, (2012, 4ª edição, Vol. 1-3, ISBN 9781936113422), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.). Uma fonte de protocolo particularmente útil para métodos usados em amplificação por PCR é PCR (Basics: From Background to Bench) por M. J. McPherson, S. G. Mailer, R. Beynon, C. Howe, Springer Verlag; 1ª edição (15 de Outubro de 2000), ISBN: 0387916008.

[000441] A presente invenção também fornece kits diagnósticos compreendendo preditivos e iniciadores degenerados para amplificar um ácido nucleico alvo no gene de PIK3CA e instruções, protocolo de amplificação e análise dos resultados. O kit pode, alternativamente, também compreender tampões, enzimas e recipientes para realização da amplificação e análise dos produtos de amplificação. O kit pode também ser um componente de um rastreio ou um kit diagnóstico compreendendo outras ferramentas, tais como microarranjos de DNA ou outros suportes. De preferência, o kit também fornece um ou mais modelos de controle, tais como ácidos nucleicos isolados a partir de amostras de tecido normal, e/ou uma série de amostras que representam diferentes variâncias nos genes de referência.

[000442] Em uma modalidade, o kit fornece dois ou mais pares de iniciadores, cada par capaz de amplificação de uma região diferente do gene de referência (PIK3CA) (cada região um sítio de variância potencial) deste modo, fornecendo um kit para análise de expressão de diversas variâncias gênicas em uma amostra biológica em uma reação ou várias reações paralelas.

[000443] Os iniciadores nos kits podem ser marcados, por exemplo, fluorescentemente marcados, para facilitar a detecção dos produtos de amplificação e consequente análise de variâncias de ácido nucleico. O kit pode também permitir que mais de um desvio seja detectado em uma análise. Um kit combinado, consequentemente, compreenderá iniciadores capazes de amplificar diferentes segmentos do gene de referência. Os iniciadores podem ser diferencialmente marcados, por exemplo, usando diferentes marcadores fluorescentes, de modo a diferenciar entre as variâncias.

[000444] Também são descritos kits para uso para detecção de mutações em PIK3CA incluindo, porém sem limitações, os kits de detecção de mutações em PIK3CA comercializados por empresas de diagnóstico, incluindo Qiagen e Roche Molecular Systems.

[000445] Em outro aspecto, a invenção proporciona um método de tratamento de um paciente que está sofrendo de câncer compreendendo: determinação do estado de tipo selvagem ou mutante do gene de PIK3CA em células tumorais do paciente e, se o gene de PIK3CA é mutante, administração, ao paciente, de uma quantidade eficaz de um composto de Fórmula (I).

[000446] Conforme usado aqui, os termos "eficaz" e "eficácia" incluem tanto eficácia farmacológica quanto segurança fisiológica. Eficácia farmacológica refere-se à capacidade do tratamento de obter um efeito biológico desejado no paciente. Segurança fisiológica refere-se ao nível de toxicidade ou outros efeitos fisiológicos adversos a nível celular, de órgãos e/ou de organismo (muitas vezes ditos como efeitos colaterais) resultantes de administração do tratamento. "Menos eficaz" significa que o tratamento resulta em um menor nível terapêuticamente significativo de eficácia farmacológica e/ou um nível terapêuticamente maior de efeitos fisiológicos adversos.

[000447] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado

o uso de um composto de Fórmula (I) para tratamento de um paciente com câncer cujas células tumorais foram identificadas como possuindo um gene de PIK3CA mutante.

[000448] De acordo com outro aspecto da invenção, é proporcionado um composto de Fórmula (I) para tratamento de cânceres com células tumorais identificadas como trazendo um gene de PIK3CA mutante.

[000449] Em ainda outras modalidades, a invenção refere-se a uma composição farmacêutica compreendendo um composto de Fórmula (I) para uso na prevenção e tratamento de câncer com células tumorais identificadas como trazendo um gene de PIK3CA mutante.

[000450] Para todos os aspectos acima, formas mutantes de PIK3CA são determinadas/identificadas em todas as posições em todo o gene.

[000451] Para todos os aspectos acima, usando os tumores, tal como câncer de mama, como um exemplo, determinadas formas mutantes de PIK3CA determinadas/identificadas são aquelas nas posições R38, R88, N345 5, C420, E453, P539, E542K, E545K, Q546, M1043, M1043 e H1047R,

[000452] Para todos os aspectos acima, usando os tumores, tal como câncer de mama, como um exemplo, determinadas formas mutantes de PIK3CA determinadas/identificadas são aquelas nas posições E542, E545 e H1047.

Exemplos de Assistência de Saúde Personalizada/Medicina Personalizada

Ensaio de Proliferação Celular Em Linhagens de Células Tumorais

[000453] A sensibilidade de um painel de linhagens de células de câncer humano aos efeitos dos compostos foi determinada em um ensaio de proliferação padrão. Detalhes do protocolo de ensaio são indicados sob ensaio(s) biológico(s) (g), acima.

Análise de Correlação de Mutação

Métodos

[000454] Medição de dados farmacológicos de inibição de crescimento celular em resposta ao tratamento com o Exemplo 3 foi obtida para um conjunto de 209 linhagens de células de câncer a partir de uma variedade de tecidos e de várias fontes. Cada linhagem de células foi classificada como sensível ($GI_{50} \leq 1,0 \mu M$) ou resistente ($GI_{50} > 1,0 \mu M$).

[000455] O estado de mutação para os genes em cada linhagem de células foi obtido ao integrar os resultados de fontes internas (Astra-Zeneca) e públicas. Os dados públicos incluíam todos os dados de linhagens de células dos bancos de dados Genomics of Drug Sensitivity in Cancer Project, release 3 (Garnett M.J. *et al.* Nature, 2012, Mar 483, 570-5), Cancer Cell Line Encyclopedia Project (Barretina J. *et al.*, Nature 2012, 483, 603-7) e Catalogue of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC) (release v61; <http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/>; Forbes S.A. *et al.* Nucleic Acids Res. 2011,39 (edição do banco de dados): D945-50; Forbes S.A. *et al.*, Curr Protoc Hum Genet. 2008; Capítulo 10: Unidade 10.11) e artigos de periódicos selecionados. Mutações silenciosas em regiões codificadoras (variantes sinônimas) e polimorfismos não sinônimos foram excluídos e, para fins desta análise, a zigosidade de mutações foi ignorada. Para cada combinação de linhagem de células e gene, o estado foi resumido como mutante (MUT), de tipo selvagem (WT) ou inconsistente (INCON). Alguns casos inicialmente inconsistentes (observações WT e MUT independentes para o mesmo gene na mesma linhagem de células) foram resolvidos por ponderação de observações internas e aquelas para o subconjunto Cancer Cell line Project (CCLP) do COSMIC ou selecionando um estado após revisão manual. Nos casos onde observações inconsistentes não puderam ser

resolvidas, o identificador INCON foi retido e o estado do gene foi considerado desconhecido durante análise.

[000456] As associações entre o estado de mutação e a resposta foram identificadas construindo tabelas de contingência para cada gene e determinando as proporções de chances e p-valores por teste exato de Fisher duplamente configurado. As linhagens de células classificadas como marginais para a resposta foram excluídas da análise inicial para identificar biomarcadores candidatos. Para o estado de mutação, MUT ou WT encontrados foram contados e genes com menos de 4 linhagens de células WT ou 4 linhagens de células MUT também foram excluídos.

Resultados e Discussão

[000457] Foram identificadas associações entre estado de mutação e a resposta, conforme descrito em Métodos. A resposta da linhagem de células ao Exemplo 3 e o estado genético correspondente ao gene de PIK3CA são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3. Os dados de farmacologia, classificação de resposta e o estado de mutação do gene de PIK3CA para as linhagens de células usados neste estudo.

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μ M	PIK3CA
RS411	Sensível	Sangue/linfa	9,03E-02	WT
T47D	Sensível	Mama	0,1982	MUT
H596	Sensível	Pulmão	0,3018	MUT
MCF7	Sensível	Mama	0,3094	MUT
MV411	Sensível	Sangue/linfa	0,3816	WT
HRA19	Sensível	Reto	0,3926	MUT
IM95M	Sensível	Estômago	0,4359	MUT
MDAMB453	Sensível	Mama	0,4564	MUT
JEK01	Sensível	Sangue/linfa	0,4994	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μM	PIK3CA
SNU601	Sensível	Estômago	0,5063	MUT
HCC1187	Sensível	Mama	0,5088	WT
SW48	Sensível	Cólon	0,5131	MUT
H1703	Sensível	Pulmão	0,5144	WT
THP1	Sensível	Sangue/linfa	0,5281	WT
LK2	Sensível	Pulmão	0,5884	WT
HUPT4	Sensível	Pâncreas	0,6408	WT
L363	Sensível	Sangue/linfa	0,6812	MUT
TCCSUP	Sensível	Bexiga	0,7237	MUT
VMCUB1	Sensível	Bexiga	0,7319	MUT
RERFLCSQ1	Sensível	Pulmão	0,7711	MUT
HCC1419	Sensível	Mama	0,7799	WT
LNCAPCASRES	Sensível	Próstata	0,7924	WT
CCK81	Sensível	Cólon	0,8031	MUT
HCC1954	Sensível	Mama	0,8794	MUT
SW948	Sensível	Cólon	0,9111	MUT
PANC0203	Sensível	Pâncreas	0,9628	WT
BFTC905	Sensível	Bexiga	0,9662	WT
REH	Resistente	Sangue/linfa	1,047	WT
SNU216	Resistente	Estômago	1,072	WT
SKC01	Resistente	Cólon	1,128	WT
SUM52PE	Resistente	Mama	1,145	WT
RT11284	Resistente	Bexiga	1,171	WT
OVCAR3	Resistente	Ovário	1,179	WT
MOLM13	Resistente	Sangue/linfa	1,22	WT
C99	Resistente	Cólon	1,224	WT
CALU3	Resistente	Pulmão	1,296	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μM	PIK3CA
N87	Resistente	Estômago	1,301	WT
2313287	Resistente	Estômago	1,339	WT
PAMC82	Resistente	Estômago	1,366	WT
HCC1569	Resistente	Mama	1,369	WT
AGS	Resistente	Estômago	1,414	MUT
JIMT1	Resistente	Mama	1,46	MUT
HGC27	Resistente	Estômago	1,501	MUT
MKN1	Resistente	Estômago	1,579	MUT
SKBR3	Resistente	Mama	1,588	WT
SNU368	Resistente	Fígado	1,597	WT
PANC89	Resistente	Pâncreas	1,618	WT
ASPC1	Resistente	Pâncreas	1,74	WT
SNU484	Resistente	Estômago	1,785	WT
H2085	Resistente	Pulmão	1,835	WT
HARA	Resistente	Pulmão	1,906	WT
AZ521	Resistente	Duodeno	2,063	WT
HP AC	Resistente	Pâncreas	2,162	WT
N0M01	Resistente	Sangue/linfa	2,167	WT
PNT1A	Resistente	Próstata	2,17	WT
H1975	Resistente	Pulmão	2,262	MUT
OCUM1	Resistente	Estômago	2,332	WT
BT20	Resistente	Mama	2,36	MUT
HCT8	Resistente	Cólon	2,51	MUT
COLO320DM	Resistente	Cólon	2,512	WT
PANC1005	Resistente	Pâncreas	2,607	WT
SW403	Resistente	Cólon	2,61	MUT
MONOMAC6	Resistente	Sangue/linfa	2,622	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μM	PIK3CA
HPAFII	Resistente	Pâncreas	2,63	WT
HT1197	Resistente	Bexiga	2,8	MUT
LNCAPCLONEFGC	Resistente	Próstata	3,007	WT
HCC95	Resistente	Pulmão	3,107	WT
SNU620	Resistente	Estômago	3,144	WT
MOLP8	Resistente	Sangue/linfa	3,289	WT
H2291	Resistente	Pulmão	3,291	WT
DMS114	Resistente	Pulmão	3,294	WT
MHCC97L	Resistente	Fígado	3,353	WT
CFPAC1	Resistente	Pâncreas	3,384	WT
HS766T	Resistente	Pâncreas	3,467	WT
ZR751	Resistente	Mama	3,558	WT
PC3	Resistente	Próstata	3,833	WT
22RV1	Resistente	Próstata	4,144	MUT
RKO	Resistente	Cólon	4,323	MUT
977	Resistente	Bexiga	4,42	WT
MOLM16	Resistente	Sangue/linfa	4,601	WT
H358	Resistente	Pulmão	4,642	WT
LUDLU1	Resistente	Pulmão	4,646	WT
QGP1	Resistente	Pâncreas	4,865	WT
OE19	Resistente	Esôfago	5,129	WT
SW1710	Resistente	Bexiga	5,339	WT
PANC1	Resistente	Pâncreas	5,344	WT
SNU449	Resistente	Fígado	5,41	WT
647V	Resistente	Bexiga	5,464	WT
HT29	Resistente	Cólon	5,483	MUT
SNU354	Resistente	Fígado	5,604	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μM	PIK3CA
HS746T	Resistente	Estômago	5,978	WT
H1869	Resistente	Pulmão	6,044	WT
UMUC3	Resistente	Bexiga	6,217	WT
PANC0403	Resistente	Pâncreas	6,468	WT
KG1	Resistente	Sangue/linfa	6,588	WT
H520	Resistente	Pulmão	6,619	WT
HEP3B	Resistente	Fígado	6,687	WT
HCT15	Resistente	Cólon	7,268	MUT
H1793	Resistente	Pulmão	7,329	WT
U937	Resistente	Sangue/linfa	7,345	WT
H2170	Resistente	Pulmão	7,644	WT
PANC0327	Resistente	Pâncreas	8,025	WT
BEL7405	Resistente	Fígado	8,11	WT
HT1376	Resistente	Bexiga	8,199	WT
SNU638	Resistente	Estômago	8,221	WT
H322	Resistente	Pulmão	8,227	WT
DU145	Resistente	Próstata	8,239	WT
EBC1	Resistente	Pulmão	8,566	WT
JURKAT	Resistente	Sangue/linfa	8,691	WT
COLO205	Resistente	Cólon	8,934	WT
RT4	Resistente	Bexiga	8,936	WT
KATOIII	Resistente	Estômago	9,155	WT
MDAMB468	Resistente	Mama	9,325	WT
5637	Resistente	Bexiga	9,627	WT
OE33	Resistente	Esôfago	9,856	WT
LS180	Resistente	Cólon	9,942	MUT
HCCC9810	Resistente	Duto biliar	10,02	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μM	PIK3CA
H226	Resistente	Pulmão	10,1	WT
A549	Resistente	Pulmão	10,15	WT
Q.GY7703	Resistente	Fígado	11,07	WT
H647	Resistente	Pulmão	11,34	WT
MGHU3	Resistente	Bexiga	11,5	WT
H23	Resistente	Pulmão	12,3	WT
SCABER	Resistente	Bexiga	12,4	WT
H2126	Resistente	Pulmão	12,91	WT
HUPT3	Resistente	Pâncreas	13,39	WT
SW620	Resistente	Cólon	13,4	WT
CAPAN2	Resistente	Pâncreas	13,42	WT
J82	Resistente	Bexiga	13,42	MUT
HLE	Resistente	Fígado	13,47	WT
BXPC3	Resistente	Pâncreas	14,08	WT
MCF7MDR+	Resistente	Mama	14,45	WT
BEL7404	Resistente	Fígado	14,9	WT
SNU1	Resistente	Estômago	14,97	WT
KP4	Resistente	Pâncreas	15,05	WT
CAMA1	Resistente	Mama	15,47	WT
HCA7	Resistente	Cólon	15,49	WT
SNU668	Resistente	Estômago	15,51	WT
H522	Resistente	Pulmão	15,55	WT
SNU886	Resistente	Fígado	15,6	WT
SW480	Resistente	Cólon	15,9	WT
HUH7	Resistente	Fígado	15,97	WT
CALU1	Resistente	Pulmão	16,03	WT
SNU878	Resistente	Fígado	16,06	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μM	PIK3CA
HCC1806	Resistente	Mama	16,71	WT
SNU16	Resistente	Estômago	16,76	WT
GTL16	Resistente	Estômago	17,38	WT
BT549	Resistente	Mama	17,44	WT
NAMALWA	Resistente	Sangue/linfa	17,55	WT
WSUDLCL2	Resistente	Sangue/linfa	17,71	WT
SU8686	Resistente	Pâncreas	17,97	WT
H460DNP53	Resistente	Pulmão	17,98	WT
SNU761	Resistente	Fígado	18,49	WT
LOVO	Resistente	Cólon	18,64	WT
SW780	Resistente	Bexiga	19,23	WT
SKMES1	Resistente	Pulmão	19,54	WT
H2286	Resistente	Pulmão	20,03	WT
SNU5	Resistente	Estômago	21,19	WT
HCC1395	Resistente	Mama	21,81	WT
HUH1	Resistente	Fígado	22,34	WT
MDAMB231	Resistente	Mama	23,61	WT
NUGC3	Resistente	Estômago	24,15	WT
MIAPACA2	Resistente	Pâncreas	24,2	WT
SNU739	Resistente	Fígado	25,91	WT
CALU6	Resistente	Pulmão	26,15	WT
AM01	Resistente	Sangue/linfa	26,93	WT
SW1990	Resistente	Pâncreas	28,28	WT
CMK	Resistente	Sangue/linfa	28,91	WT
1A6	Resistente	Bexiga	30	WT
A2058	Resistente	Pele	30	WT
ARH77	Resistente	Sangue/linfa	30	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μM	PIK3CA
CAPAN1	Resistente	Pâncreas	30	WT
CC20	Resistente	Cólon	30	WT
H1299	Resistente	Pulmão	30	WT
H1437	Resistente	Pulmão	30	WT
H460	Resistente	Pulmão	30	MUT
H526	Resistente	Pulmão	30	WT
H838	Resistente	Pulmão	30	WT
HCC15	Resistente	Pulmão	30	WT
HCC1937	Resistente	Mama	30	WT
HCT116	Resistente	Cólon	30	MUT
HEL9217	Resistente	Sangue/linfa	30	INCON
HEPG2	Resistente	Fígado	30	WT
HLF	Resistente	Fígado	30	WT
HX147	Resistente	Pulmão	30	WT
IM9	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
JJN3	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
JVM3	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
K562	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
KU1919	Resistente	Bexiga	30	WT
MDAMB157	Resistente	Mama	30	WT
MDAMB436	Resistente	Mama	30	WT
MEC1	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
MKN74	Resistente	Estômago	30	WT
NUGC4	Resistente	Estômago	30	WT
OCIAML2	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
OCILY19	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
PC9	Resistente	Pulmão	30	WT

Linhagem de células	Categoria	Tecido	GI50 μ M	PIK3CA
RAJI	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
RAMOS	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
RERFLCAI	Resistente	Pulmão	30	WT
RPMI8226	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
SCI	Resistente	Sangue/linfa	30	WT
SKHEP1	Resistente	Fígado	30	WT
SMMC7721	Resistente	Fígado	30	WT
SNU398	Resistente	Fígado	30	WT
SW900	Resistente	Pulmão	30	WT
T24	Resistente	Bexiga	30	WT
YAPC	Resistente	Pâncreas	30	WT

[000458] O gene para o qual as mutações foram mais fortemente correlacionadas com a sensibilidade ao Exemplo 3 foi PIK3CA. Apenas 12 de 177 linhagens de células PIK3CA WT (7,7%) eram sensíveis ao Exemplo 3, enquanto que 15 das 32 linhagens de células (46,9%) que são mutantes para PIK3CA eram sensíveis, o que corresponde a uma proporção de chances de 12,1 e um p-valor de $1,2 \times 10^{-7}$ (vide Tabela 4).

Tabela 4. Tabela de contingência para estado de mutação em PIK3CA e resposta ao Exemplo 3.

Estado de mutação (PIK3CA)	Resposta	
	Sensível	Resistente
MUT	15	17
WT	12	165

Proporção de chances: 12,1

p-valor: $1,2 \times 10^{-7}$

[000459] Conforme já foi mencionado, foi relatado que medição do

estado de mutação ou estado de ativação de genes adicionais, tal como KRAS, um marcador potencial de resistência em tumores com PIK3CA ou PI3K- α aberrante ou desregulada, poderia ajudar a aumentar a previsibilidade de uma abordagem de medicina personalizada.

[000460] Foi exemplificado isso para o conjunto de dados acima comparando o enriquecimento de mutações em KRAS em células mutantes para PIK3CA com a resposta à inibição da linhagem de células. A análise foi realizada limitada a linhagens de células contendo mutações "hotspot" dos dois genes (nos códons E542, E545 e H1047 para PIK3CA e nos códons K12, 13 e Q61 para KRAS). Isto demonstrou que, em linhagens de células mutantes para PIK3CA, mutações em KRAS conferiam resistência à inibição pelo Exemplo 3.

[000461] - Vinte e oito linhagens de células continham mutações ativadoras em PIK3CA.

[000462] - 6 de 19 linhagens de células (31,6%) continham uma mutação ativadora em PIK3CA e um gene de KRAS de tipo selvagem era resistente ao Exemplo 3.

[000463] - 7 de 9 linhagens de células mutantes para PIK3CA (77,8%) continham mutações em KRAS coexistentes e eram resistentes ao Exemplo 3.

[000464] Isso se traduz em uma proporção de chances de 7,5 e um p-valor de 0,042 (vide Tabela 5).

Estado de Mutação	Resposta	
	Sensível	Resistente
KRAS e PIK3CA MUT	2	7
PIK3CA MUT e KRAS WT	13	6

Proporção de chances: 7,5

p-valor: 0,042

Tabela 5. Tabela de contingência para estado de mutação em PIK3CA e KRAS e resposta ao Exemplo 3.

EXEMPLOS

[000465] A invenção será agora ilustrada nos Exemplos a seguir nos quais, em geral:

(i) as operações foram realizadas em temperatura ambiente, isto é, na faixa de 17 a 25°C, e sob uma atmosfera de um gás inerte, tal como nitrogênio, a menos que indicado de outra forma;

(ii) as evaporações foram realizadas por meio de evaporação rotativa ou usando equipamento Genevac *in vacuo* e os procedimentos de processamento foram realizados após remoção de sólidos residuais através de filtração;

(iii) as purificações por meio de cromatografia rápida foram realizadas em um sistema automatizado Armen Glider Flash: Spot II Ultimate (Armen Instrument, Saint-Ave, França) usando cartuchos Merck Normal Phase Si60 Silica (granulometria: 15-40 ou 40-63 µm) obtidos da Merck, Darmstad, Alemanha;

(iv) cromatografia preparativa foi realizada em um instrumento Waters (600/2700 ou 2525) equipado com espectrômetros de massa ZMD ou ZQ ESCi e uma coluna de fase reversa Waters X-Terra ou Waters X-Bridge ou Waters SunFire (C-18, 5 mícrons, sílica, 19 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento, taxa de fluxo de 40 mL/minuto), usando misturas decrescentemente polares de água (contendo carbonato de amônio a 0,2%) e acetonitrila como eluente;

(v) os rendimentos, quando presentes, não são necessariamente o máximo atingível;

(vi) em geral, as estruturas dos produtos finais de fórmula I foram confirmadas por meio de ressonância magnética nuclear (**Nuclear Magnetic Resonance - RMN**); os valores dos desvios químicos de RMN foram medidos na escala delta [espectros de ressonância

magnética de prótons foram determinados usando um instrumento Bruker Avance 500 (500 MHz)]; as medições foram realizadas em temperatura ambiente, salvo indicação em contrário; as seguintes abreviaturas foram usadas: s, singleto; d, duplete; t, tripleto; q, quarteto; m, multiplete; dd, duplete de dupletos; ddd, duplete de duplete de duplete; dt, duplete de tripletos; bs, sinal largo;

(vii) em geral, produtos secundários gerais da Fórmula I foram igualmente caracterizados por meio de espectroscopia de massa após cromatografia de líquido (**Liquid Chromatography Mass Spectroscopy - LCMS**); LCMS foi realizada usando um Waters Alliance HT (2790 & 2795) equipado com um espectrômetro de massa Waters ZQ ESCi ou ZMD ESCi e uma coluna C-18 X Bridge de 5 μm (2,1 x 50 mm) com uma taxa de fluxo de 2,4 ml/min, usando um sistema solvente de 95% de A + 5% de C a 95% de B + 5% de C durante 4 minutos, em que A = água, B = metanol, C = metanol:água a 1:1 (contendo carbonato de amônio a 0,2%);

(viii) os intermediários, em geral, não foram totalmente caracterizados e a pureza foi avaliada por meio de cromatografia em camada fina, espectrometria de massa, HPLC e/ou análise de RMN;

[000466] (ix) os espectros de difração de pó por raios X foram determinados (usando um Bruker D4 Analytical Instrument) montando uma amostra do material cristalino em um único suporte de cristal de silício (**Single Silicon Crystal - SSC**) Bruker e espalhando a amostra em uma camada fina com o auxílio de uma lâmina de microscópio. A amostra foi centrifugada a 30 rotações por minuto (para melhorar a estatística de contagem) e irradiada com raios X gerados por um tubo de focagem longo-(ino de cobre operado a 40 kV e 40 mA, com um comprimento de onda de 1,5418 angstroms. A fonte de raios X colimada foi passada através de uma fenda de divergência variável automática fixada em V20 e a radiação refletida dirigida através de uma fenda anti-

dispersão de 5,89 mm e um detector de fenda de 9,55 mm. A amostra foi exposta durante 0,03 segundos por incrementos de $0,00570^\circ$ 2-teta (modo de varredura contínua) sobre a faixa de 2 graus a 40 graus 2-teta no modo teta-teta. O tempo de operação foi de 3 minutos e 36 segundos. O instrumento era equipado com um detector sensível à posição (Lynxeye). Controle e captura de dados foram realizados por meio de um 686 NT 4.0 Workstation Dell Optiplex operando com um software Diffrac+. Os especialistas na técnica de difração de pó por raios X perceberão que a intensidade relativa dos picos pode ser afetada, por exemplo, por grãos acima de 30 microns de tamanho e proporções não unitárias que possam afetar a análise de amostras. Aqueles versados na técnica também perceberão que a posição de reflexão pode ser afetada pela altura precisa na qual a amostra fica no difratômetro e a calibração zero do difratômetro. A planaridade da superfície da amostra pode também ter um pequeno efeito. Assim, os dados do padrão de difração apresentados não devem ser entendidos como valores absolutos;

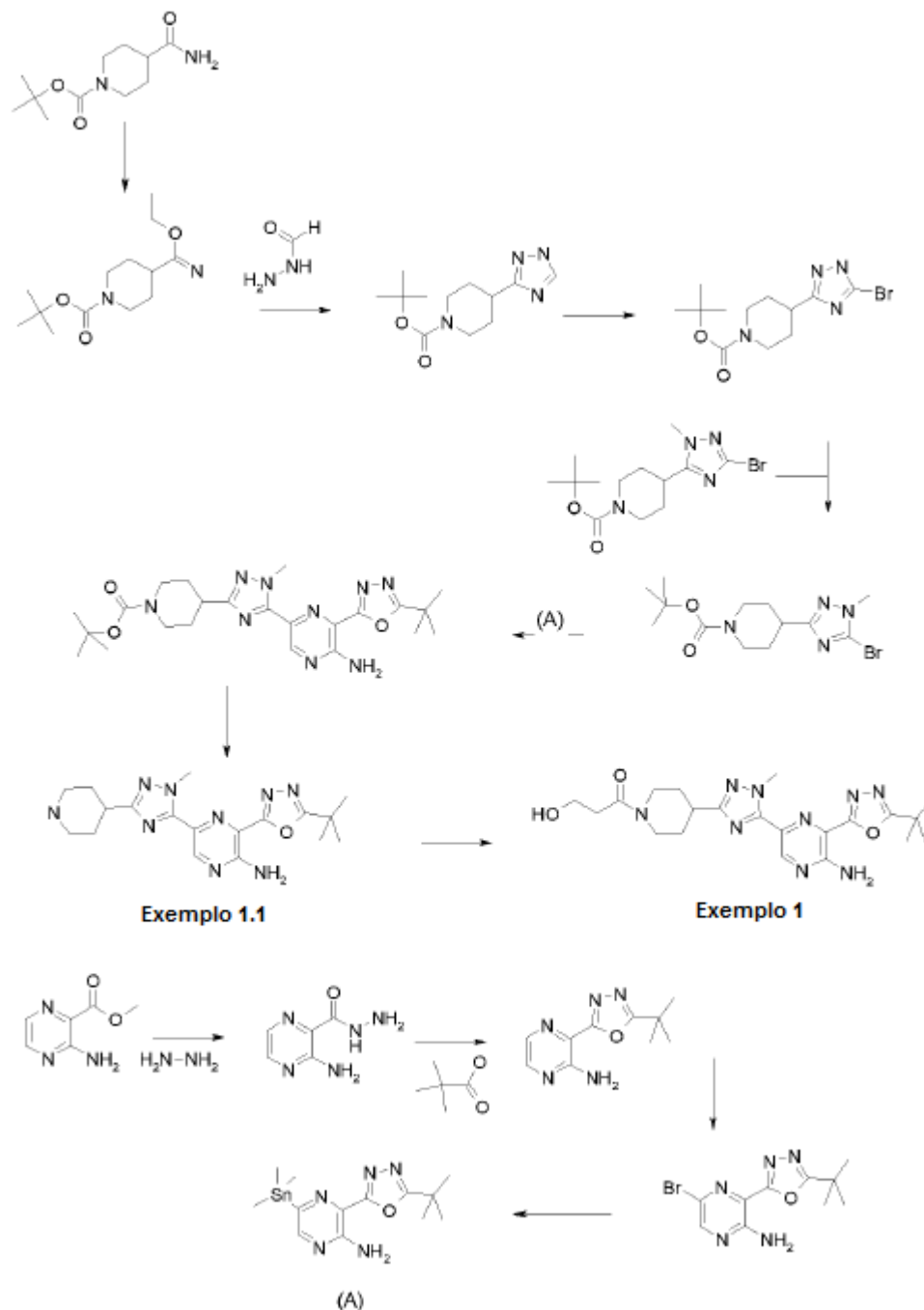
(x) Calorimetria de Varredura Diferencial foi realizada usando um instrumento TA Instruments DSC Q1000. Tipicamente, menos de 5 mg de material contido em um recipiente de alumínio padrão equipado com uma tampa foram aquecidos ao longo da faixa de temperatura de 25°C a 300°C em uma taxa de aquecimento constante de 10°C por minuto. Um gás de purga usando nitrogênio foi usado em uma taxa de fluxo de 50 mL por minuto; e

[000467] (xi) as abreviaturas a seguir foram usadas:

aq.	aquoso
CDCl ₃	deutero-clorofórmio
CHCl ₃	clorofórmio
DBU	1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno
DCM	diclorometano
DEA	dietilamina

DIPEA	N-etil-N-isopropilpropan-2-amina
DMA	N,N-dimetilacetamida
DMF	N-dimetilformamida
DMSO	sulfóxido de dimetila
DSC	Calorimetria de <u>Varredura</u> Diferencial
DtAD	diazeno-1,2-dicarboxilato de (E)-di-terc-butila
EDCI	cloridrato de 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida
Éter	dietil éter
EtOH	etanol
EtOAc	acetato de etila
% Ee	% de excesso enantiomérico
HOPO	N-óxido de 2-hidróxi-piridina
HPLC	Cromatografia de líquido de alto desempenho
IPA	álcool isopropílico
MCN	acetonitrila
MeOH	metanol
MIBK	metilisobutilcetona
MTBE	metil-terc-butil éter
NMP	1-metil-2-pirrolidona
ta	temperatura ambiente
sat.	saturado
sol.	solução
THF	tetra-hidrofurano
TEA	triethyl amina
TBTU	tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d][1,2,3]triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisourônio
v/v	volume/volume
TFA	ácido trifluoroacético

Exemplo 1: 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-Metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona



[000468] Ácido 3-hidróxi-propanoico (soln. a 30% v/v em água) (200 μl , 47,0 mg, 0,52 mmol) foi evaporada até secagem, então, submetida à destilação azeotrópica com o tolueno. O ácido foi dissolvido em NMP (1 mL) e peneiras moleculares (100 mg, 0,26 mmol), N-etil-N-

isopropilpropan-2-amina (0,136 mL, 0,78 mmol) foram adicionados, seguido pela adição de tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d] [1,2,3]-triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisourônio (209 mg, 0,65 mmol). Após 30 minutos de agitação, 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (100 mg, 0,26 mmol) foi adicionada e a mistura foi agitada durante 2 horas. A mistura de reação foi purificada por meio de HPLC preparativa usando uma coluna Waters X-Bridge de fase reversa (C-18, 5 microns, sílica, 19 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento, taxa de fluxo de 40 ml/minuto) e misturas decrescentemente polares de água (contendo carbonato de amônio a 0,2%) e acetonitrila como eluente.

[000469] As frações contendo o composto desejado foram evaporadas até secagem para proporcionar 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (45,0 mg, 37,9%) como um sólido amarelo claro: Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 1,52 (9H, s), 1,79-1,94 (2H, m), 2,07-2,15 (2H, m), 2,58 (2H, 10 t), 2,84-2,94 (1H, m), 3,00 - 3,10 (1H, m), 3,17-3,26 (1H, m), 3,53 (1H, t), 3,86-3,94 (3H, m), 4,30 (3H, s), 4,56 -4,62 (1H, m), 9,02 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 456$.

[000470] 3-(5-terc-Butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (**Exemplo 1.1**) foi preparado como segue.

[000471] A 20°C, 4-carbamoilpiperidina-1-carboxilato de terc-butila (47 g, 205,88 mmol) em diclorometano (500 mL) foi adicionado gota a gota a uma solução agitada de hexafluorofosfato de trietilaxônio (V) (56,2 g, 226,47 mmol) em diclorometano (500 mL) ao longo de um período de 45 minutos, sob nitrogênio. A solução resultante foi agitada a 20°C durante a noite. Uma solução aquosa saturada de Na_2CO_3 , então, foi adicionada até que um pH de 8 fosse obtido. As fases foram decantadas e a fase aquosa foi extraída novamente com 200 ml de

CH₂Cl₂, então, as fases orgânicas foram secas sobre MgSO₄, filtradas e concentradas para se obter 1-carboxilato de terc-butil-4-(etoxi(imino)metil)piperidina (51,0 g, 97%) como um líquido incolor: Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) 1,28 (3H, t), 1,46 (9H, s), 1,47 (2H, m), 1,79-1,93 (2H, m), 2,28 (1H, m), 2,73 (2H, m), 4,10 (2H, q), 4,13-4,18 (2H, m); Espectro de Massa [M+H]⁺ = nenhum íon de massa.

[000472] A uma solução agitada de 4-(etóxi(imino)metil)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (51 g, 198,95 mmols) em dioxano (500 mL), foi adicionada formidrazina (17,92 g, 298,43 mmols). Esta solução foi deixada agitar a 40°C durante a noite, sob N₂, resultando na precipitação de um sólido branco (hidrazida intermediária). A mistura de reação foi, então, aquecida a 80°C durante 6 horas, esfriada para a temperatura ambiente e concentrada. O resíduo foi dissolvido em 500 mL de CH₂Cl₂ e 300 mL de água foram adicionados. As fases foram decantadas e a fase orgânica foi lavada com salmoura, seca sobre MgSO₄, filtradas e concentradas para se obter 1-carboxilato de terc-butil-4-(1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina (46,0 g, 92%) como um sólido branco: Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) 1,47 (9H, s), 1,76 (2H, m), 1,98-2,11 (2H, m), 2,91 (2H, s), 2,97 -3,08 (m, 1H), 4,06-4,23 (2H, m), 8,05 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = nenhum íon de massa.

[000473] A uma solução agitada de 4-(1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (22 g, 87,19 mmols) em diclorometano (250 mL) foi adicionado hidróxido de sódio a 2N (131 mL, 261,58 mmols). A mistura de reação foi vigorosamente agitada com um agitador mecânico e uma solução de tribrometo de benziltrimetilamônio (37,4 g, 95,91 mmols) em diclorometano (250 mL) foi, então, adicionada gota a gota, mantendo a temperatura a cerca de 15°C. A mistura de reação foi deixada agitar em temperatura ambiente durante uma hora e HCl a 2N foi adicionado para proporcionar um pH de 5 (mantendo a temperatura a cerca de 15°C). As fases foram decantadas e a fase or-

gânica foi lavada com H₂O (2x1 L), seca sobre MgSO₄, filtrada e concentrada para se obter 4-(5-bromo-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (25,00 g, 87%) como um sólido quase branco: Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) 1,46 (9H, s), 1,67 -1,84 (2H, m), 1,90-2,13 (2H, m), 2,77-2,96 (2H, m), 2,98-3,10 (1H, m), 3,94-4,35 (2H, m); Espectro de Massa [M+H]⁺ = nenhum íon de massa.

[000474] A uma suspensão agitada de 4-(5-bromo-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (26 g, 78,50 mmols) em tolueno (200 mL) e metanol (50 mL) foi adicionado gota a gota (diazometil)trimetilsilano (solução a 2M) em hexano (43,2 mL, 86,35 mmols) sob N₂, mantendo a temperatura a cerca de 20°C: liberação de gás e uma pequena exotermia foram observadas. A solução amarela obtida foi agitada em temperatura ambiente durante uma hora. O solvente foi evaporado e o óleo resultante foi purificado em sílica eluindo com EtOAc a 40% em éter de petróleo para se obter 4-(5-bromo-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (15,00 g, 55,3%) como um óleo: Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) 1,46 (9H, s), 1,65-1,78 (2H, m), 1,90-2,01 (2H, m), 2,68-3,02 (3H, m), 3,83 (3H, s), 3,94 -4,31 (2H, m); Espectro de Massa [M+H]⁺ = nenhum íon de massa.

[000475] Mono-hidrato de hidrazina (34 ml, 1094,95 mmols) foi adicionado aos poucos a uma suspensão agitada de 3-aminopirazina-2-carboxilato de etila (21,3 g, 139,09 mmols) em etanol (65 mL) em temperatura ambiente. A pasta resultante foi agitada a 60°C durante duas horas, esfriada para a temperatura ambiente e filtrada. O sólido foi lavado com etanol gelado (2 x 25 ml) e seco até um peso constante para proporcionar 3-aminopirazina-2-carbo-hidrazida (20,75 g, 97%) como um sólido bege: Espectro de ¹H RMN (DMSO-d₆) 4,49 (2H, d), 7,46 (2H, br s), 7,78 (1H, d), 8,17 (1H, d), 9,79 (1H, t); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 154.

[000476] Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d] [1,2,3] triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisourônio (47,7 g; 148,69 mmols) foi adicionado aos poucos ao longo de 15 minutos a uma suspensão agitada de N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (70,6 mL, 405,51 mmols), ácido piválico (17,08 mL, 148,69 mmols) e 3-aminopirazina-2-carbo-hidrazida (20,7 g, 135,17 mmol) em acetonitrila (350 mL) e a mistura de reação foi agitada a 80°C durante 20 minutos (uma solução foi obtida). A mistura de reação foi esfriada para 0°C e N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (70,6 mL, 405,51 mmols), seguido por cloreto de 4-metilbenzeno-1-sulfonila (77 g, 405,51 mmols) foram adicionados ao longo de um período de 15 minutos. A mistura de reação (suspensão amarela) foi levada a refluxo (solubilização) e, então, deixada agitar em temperatura ambiente durante 14 horas, produzindo uma solução cor de laranja escuro. A solução foi concentrada. O resíduo foi diluído com diclorometano, lavado com água, salmoura, seco sobre sulfato de magnésio e concentrado. O produto bruto foi purificado por meio de cromatografia rápida em gel de sílica eluindo com acetato de etila em diclorometano a 0 a 40%. O solvente foi evaporado até secagem. A mistura resultante foi triturada com éter (100 mL), filtrada, lavada com o mínimo de éter e seca para se obter 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (20,8 g, 70,2%) como um sólido amarelo claro: Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) 1,53 (9H, s), 1,58-1,68 (2H, m), 6,67 (2H, s), 8,13 (2H, dt); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 220.

[000477] 1-Bromopirrolidina-2,5-diona (18,57 g, 104,36 mmols) foi adicionado aos poucos a uma solução de 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (20,8 g, 94,87 mmols) em THF (320 mL) e a solução foi agitada em temperatura ambiente durante 16 horas. A mistura de reação foi concentrada e o resíduo foi dissolvido em diclorometano (300 mL), lavado com água (2 x 150 mL), salmoura, seco sobre sulfato de magnésio e concentrado. O solvente foi evaporado e

o produto bruto foi purificado por meio de cromatografia rápida sobre gel de sílica, eluindo com acetato de etila em diclorometano a 0 a 10%. O solvente foi evaporado até secagem para se obter 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (25,5 g, 90%) como um sólido bege: Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 1,52 (9H, s), 8,23 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 300$.

[000478] A uma suspensão de 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (45 g, 150,94 mmols) em tolueno (450 mL) foram adicionados 1,1,1,2,2,2-hexametildestano (37,6 mL, 181,12 mmols) e cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio (II) (5,30 g, 7,55 mmols). A mistura de reação foi desgaseificada com argônio e aquecida a 80°C durante duas horas (solubilização após aquecimento, solução cor de laranja, então, reprecipitação e se tornou preta, indicando que a reação está completa). A mistura de reação foi esfriada, concentrada e o resíduo foi dissolvido em CH_2Cl_2 e filtrado sobre Decalite para remover as impurezas insolúveis. O filtrado foi concentrado e purificado em sílica eluindo com EtOAc em CH_2Cl_2 a 0-10%. O solvente foi concentrado para se obter 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(trimetilestanil)pirazin-2-amina (22,63 g, 39,2%) como um sólido laranja: Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 0,38 (9H, s), 1,53 (9H, s), 6,49 (2H, s largo), 8,13 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 384$.

[000479] A uma suspensão agitada de 4-(5-bromo-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila 20 (2,700 mg, 7,82 mmols) e 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(trimetilestanil)pirazin-2-amina (2,988 mg, 7,82 mmols) em 4-metil-2-pentanol (28 ml) foram adicionados cloreto de lítio (995 mg, 23,46 mmols) e cloreto de bis(trifenilfosfina)paládio (II) (220 mg, 0,31 mmol). A mistura foi desgaseificada com argônio e aquecida a 140°C durante duas horas. A reação foi esfriada e o precipitado resultante foi coletado por meio de filtração, lavado com isopropanol (25 mL), água (25 mL) e seco sob suc-

ção. A fração orgânica foi concentrada com isopropanol e o precipitado formado foi coletado e combinado com o precipitado principal, proporcionando 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (3,0 g, 79%): Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,41 (9H, s), 1,45 (9H, s), 1,50-1,68 (2H, m), 1,95 (3H, dd), 2,78-3,05 (1H, m), 3,96 (3H, d), 4,21 (3H, s), 8,86 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 484$.

[000480] Uma solução de 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (3 g, 6,20 mmols) em TFA (15 mL) e CH_2Cl_2 (15 mL) foi agitada a 25°C durante uma hora. A mistura foi submetida à destilação azeotrópica com tolueno, uma solução de amônia a 7N em metanol e diclorometano foram adicionados e a mistura foi adsorvida sobre gel de sílica. O produto bruto foi purificado por meio de cromatografia rápida sobre gel de sílica eluindo com metanol em diclorometano a 0-8%, seguido por amônia metanólica em diclorometano a 0-10%. O solvente foi evaporado até secagem para obter 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (2,040 g, 86%) como um sólido cristalino amarelo: Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,45 (9H, s), 1,55-1,66 (2H, m), 1,86 (2H, dd), 2,52-2,61 (2H, m), 2,69-2,78 (1H, m), 2,95-3,02 (2H, m), 4,20 (3H, s), 8,86 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 384$.

Isolamento de forma cristalina única do Exemplo 1

[000481] Os espectros de difração de pó por raios X do material isolado mostrou que o material era cristalino, mas uma mistura de formas polimórficas. Este material tinha um ponto de fusão de 226,4°C (início).

[000482] A Forma A do material foi produzida misturando-se o material original em acetonitrila a 25°C. Aproximadamente 20 mg do material original foram colocados em um frasco com uma barra de agitação magnético e aproximadamente 2 mL de acetonitrila adicionados. O

frasco foi, então, selado hermeticamente com uma tampa e deixado em agitação sobre uma placa de agitação magnética. Após cerca de 5 dias, a amostra foi removida da placa, a tampa retirada e a suspensão deixada secar sob condições ambiente antes de ser analisada por XRPD e DSC. Esta forma (Forma A) foi determinada como sendo cristalina por XRPD. Este material tinha um ponto de fusão 227,2°C (início).

[000483] A mesma forma cristalina pode ser obtida por meio de agitação do material bruto em acetonitrila durante a noite em temperatura ambiente, então, filtrando o sólido resultante, lavando com acetonitrila fria e secando.

[000484] Em um aspecto da invenção, é proporcionado um processo para formação de uma forma cristalina do Exemplo 1 (Forma A) através de mistura de uma amostra do composto em acetonitrila. Dez picos de difração de pó por raios X são apresentados na Tabela abaixo:

Dez picos de difração de pó por raios X para Forma A do Exemplo 1

Ângulo 2-Teta (2θ)	Intensidade%
5,1	100,0
18,0	22,5
10,2	22,0
11,7	17,8
19,4	14,5
18,5	14,2
14,8	12,6
26,7	11,0
26,6	10,6
17,8	9,9

[000485] Um espectro de difração de pó por raios X do Exemplo 1, Forma A, é mostrado na Figura 1. Análise DSC do Exemplo 1, Forma A, mostra um endoterma de fusão com um início a 227,2°C e um pico a 228,6°C (Figura 2).

[000486] Assim, a análise DSC mostra que o Exemplo 1, Forma A, é um sólido com um início de fusão a cerca de 227,2°C e um pico de fusão a 228,6°C.

[000487] Um DSC do Exemplo 1, Forma A, é mostrado na Figura 2.

Difração de Pó por Raios X

[000488] Instrumento analítico: Bruker D4.

[000489] O difratograma de raios X foi determinado colocando uma amostra do material cristalino em um suporte de montagem Bruker de um único cristal de silício (SSC) e espalhando a amostra em uma camada fina com o auxílio de uma lâmina de microscópio. A amostra foi centrifugada a 30 rotações por minuto (para melhorar as estatísticas de contagem) e irradiada com raios X gerados por um tubo de focagem longo-fino de cobre operado a 40 kV e 40 mA com um comprimento de onda de 1,5418 angstroms. A fonte de raios X colimada foi passada através de uma fenda de divergência variável automática fixada em V20 e a radiação refletida dirigida através de uma fenda anti-dispersão de 5,89 mm e 9,55 mm de um detector de fenda. A amostra foi exposta durante 0,03 segundos por incremento de 0,00570° 2-teta (modo de varredura contínua) ao longo da faixa de 2 graus a 40 graus 2-teta no modo teta-teta. O tempo de operação foi de 3 minutos e 36 segundos. O instrumento era equipado com um detector sensível à posição (Lynxeye). Controle e captura de dados foram por meio de um 686 NT 4.0 Workstation Dell Optiplex operando com um software Diffrac+. Aqueles versados na técnica de difração de pó por raios X perceberão que a relativa intensidade dos picos pode ser afetada, por exemplo, grãos acima de 30 microns de tamanho e proporções não

unitárias que possam afetar a análise de amostras. Aqueles versados na técnica também perceberão que a posição de reflexão pode ser afetada pela altura precisa na qual a amostra fica no difratômetro e a calibração zero do difratômetro. A planaridade da superfície da amostra pode também ter um pequeno efeito. Consequentemente, os dados do padrão de difração apresentados não devem ser tomados como valores absolutos.

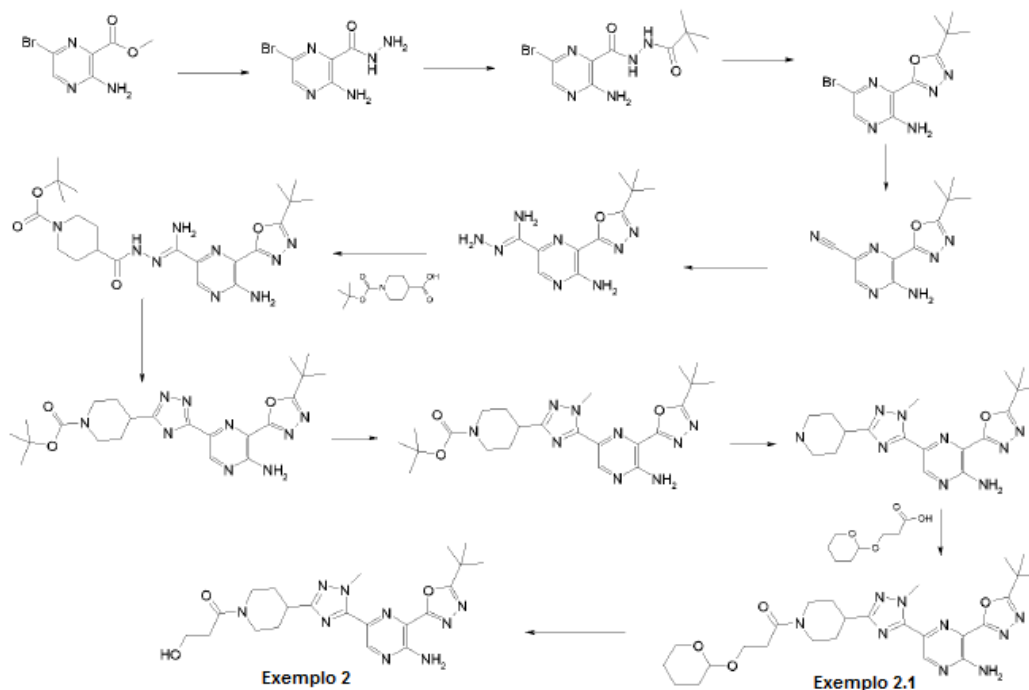
Calorimetria de Varredura Diferencial

[000490] Instrumento analítico: TA Instruments DSC Q1000.

[000491] Tipicamente, menos de 5 mg de material contido em um recipiente de alumínio padrão equipado com uma tampa foram aquecidos ao longo da faixa de temperatura de 25°C a 300°C em uma taxa de aquecimento constante de 10°C por minuto. Um gás de purga usando nitrogênio foi usado em uma taxa de fluxo de 50 ml por minuto.

[000492] Uma síntese alternativa do composto do Exemplo 1 é fornecida abaixo como Exemplo 2.

Exemplo 2: 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona



[000493] 4-metilbenzeno-sulfonato de piridina (3,58 g, 14,25 mmols) foi adicionado a uma suspensão de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propan-1-ona (37 g, 68,57 mmols) em metanol (275 mL) sob nitrogênio. A mistura foi agitada a 60°C durante 1,5 horas. A mistura era solúvel após 5 minutos. A mistura foi mantida a 50°C durante a noite, tempo durante o qual se formou um precipitado. A mistura de reação foi dissolvida em diclorometano (400 mL), lavada com água (300 mL) e salmoura (100 mL). Os extratos aquosos foram lavados com DCM (100 mL) e as camadas orgânicas combinadas foram secas sobre MgSO₄ e concentradas. O produto bruto foi purificado por meio de cromatografia rápida sobre gel de sílica eluindo com acetato de etila a 100% em metanol/acetato de etila/DCM a 10:50:40. As frações contendo produto foram evaporadas até secagem para se obter um sólido de cor bege (24,5 g). O sólido foi transformado em uma pasta durante a noite em acetonitrila (500 mL), filtrado e seco

sob alto vácuo para se obter 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (**Exemplo 2**) (24 g, 78%) como um sólido creme: Espectro de ^1H RMN (DMSO-d6) 1,51 (9H, s), 1,55-1,68 (1H, m), 1,68-1,84 (1H, m), 1,96-2,13 (2H, m), 2,78-2,93 (1H, m), 2,98 -3,1 (1H, m), 3,19-3,3 (1H, m), 3,71 (2H, q), 3,93-4,04 (1H, m), 4,27 (3H, s), 4,35 -4,48 (1H, m), 4,54 (1H, t), 7,96 (2H, s), 8,92 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 456$.

[000494] 4-(5-(5-Amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi) propan-1-ona (**Exemplo 2.1**) foi preparado como segue.

[000495] Hidrato de hidrazina (23,59 mL, 480,75 mmols) foi adicionado gota a gota a uma mistura agitada de 3-amino-6-bromopirazina-2-carboxilato de metila (100 g, 418,04 mmols) em EtOH (2 L). A mistura foi aquecida a 50°C sob nitrogênio. A suspensão espessa resultante foi agitada a 50°C durante 16 horas. Além disso, hidrazina (2,5 mL) foi adicionada em uma porção e a suspensão foi agitada a 50°C durante mais 24 horas. Etanol (500 mL) foi carregado à mistura de reação espessa e a mistura foi deixada esfriar para a temperatura ambiente. A suspensão resultante foi filtrada e o sólido foi lavado com etanol (1 L) e seco *in vacuo* para proporcionar 3-amino-6-bromopirazina-2-carbohidrazida (98 g, quantitativo) como um sólido creme: Espectro de ^1H RMN (DMSO-d6) 4,52 (2H, s), 7,59 (2H, s), 8,30 (1H, s), 9,74 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 232$.

[000496] Anidrido piválico (165 mL, 815,38 mmols) foi adicionado a uma mistura agitada de 3-amino-6-bromopirazina-2-carbohidrazida (172 g, 741,26 mmols) em acetonitrila (1,8 L) e a mistura foi aquecida a 80°C durante uma hora. A reação foi deixada agitar durante 16 horas. O material sólido amarelo requerido foi isolado por meio de filtração. O filtrado foi dividido entre EtOAc (2 L) e bicarbonato de sódio

aquoso (2 L). A camada orgânica foi lavada com salmoura saturada e seca sobre MgSO₄. A solução foi filtrada e concentrada para obter um sólido pegajoso cor de laranja, o qual foi triturado com MTBE (250 mL). O sólido amarelo insolúvel foi isolado por meio de filtração e este material mostrou ser idêntico ao primeiro sólido. Os sólidos combinados foram secos no forno a vácuo a 50°C durante 3 dias para proporcionar 3-amino-6-bromo-N-pivaloilpirazina-2-carbo-hidrazida (224 g, 96%) como um sólido amarelo: Espectro de ¹H RMN (DMSO-d₆) 1,17 (9H, s), 7,62 (2H, s), 8,37 (1H, s), 9,42-9,56 (1H, m), 10,09-10,23 (1H, m); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 318.

[000497] Cloreto de toluenossulfonila (164 g, 861,60 mmols) foi adicionado aos poucos a uma suspensão de 3-amino-6-bromo-N-pivaloilpirazina-2-carbo-hidrazida (227 g, 718,00 mmols) e N,N-diisopropiletilamina (297 mL, 1795,01 mmols) em acetonitrila (2200 mL). A mistura foi agitada durante duas horas a 70°C. A reação foi deixada esfriar para a temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi dividida entre acetato de etila (2 L) e solução de bicarbonato de sódio (2 L). A camada orgânica foi lavada com salmoura saturada, seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O sólido castanho/bege resultante foi triturado com MTBE quente (1000 mL) e isolado por meio de filtração e seco para proporcionar 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina como um sólido amarelo (187 g, 87%). Os licores-mãe foram evaporados até secagem. O sólido bruto foi triturado com MTBE (500 mL), filtrado e lavado com 100 mL de MTBE. O sólido resultante foi seco ao ar durante a noite para se obter uma segunda safra de 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (36 g, 17%) : Espectro de ¹H RMN (DMSO-d₆) 1,43 (9H, s), 7,70 (2H, s), 8,39 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 298.

[000498] Em um preparo alternativo, à 3-amino-6-bromo-N-

pivaloilpirazina-2-carbo-hidrazida (2,301 g, 7,28 mols) em MeCN (10,8 L) foram adicionados DIPEA (3,044 L, 17,48 mols) e cloreto de p-toluenossulfonila (1,665 g, 8,73 mols) aos poucos (~ 280 g x 6) a 50°C durante um período de 30 minutos. A temperatura da reação foi mantida entre 65-70°C controlando a velocidade de adição. Após a adição estar completa, a mistura de reação foi agitada a 70°C durante uma hora. A mistura foi esfriada para a temperatura ambiente e dissipada com NaHCO₃ a 5% (aquoso, 24,2 L). A suspensão resultante foi agitada durante 30 minutos e, então, filtrada. O produto foi lavado com água (14,8 L), seco a 50°C durante 16 horas. O produto foi dissolvido em DCM (12 L) e as fases foram separadas. A fase orgânica foi carregada em um bloco de sílica (6 kg) e o produto foi eluído com EtOAc/DCM a 20% (8 x 10L). A concentração do produto que continha as frações proporcionou 1987 g (92% de rendimento) com uma pureza de 99,8% por meio de HPLC.

[000499] Uma corrente de gás nitrogênio foi passada através de uma solução de 5-bromo-3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-amina (89,35 g, 239,75 mmols) em DMA (1,2 L) durante 20 minutos. Diciclo(2',4',6'-tri-2-il)fosfina (11,43 g, 23,98 mmols), tris(dibenzilidenoacetona)dipaládio (0) (5,49 g, 5,99 mmols), zinco (1,568 g, 23,98 mmols) e dicianozinco (16,89 g, 143,85 mmols) foram adicionados sequencialmente à mistura agitada. A mistura foi aquecida a 100°C e agitada durante uma hora. A mistura foi esfriada e dividida entre DCM (3 L) e água (1L). A mistura preta foi filtrada através de celite e a camada orgânica foi separada. A solução foi lavada com água e, então, com salmoura. A solução foi seca com sulfato de magnésio e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi triturado com MTBE e isolado por meio de filtração, lavando com MTBE. O bolo de filtração foi seco *in vacuo* para proporcionar 5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbonitrila (55,7 g, 95%) como um sólido de

cor de laranja claro: Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,46 (9H, s), 6,02 (1H, s), 8,38 (2H, s); Espectro de Massa [M-H] $^-$ = 242.

[000500] O produto pode ser transformado em pasta em heptanos, então, filtrado e seco como uma alternativa à trituração com MTBE.

[000501] Hidrato de hidrazina (82 mL, 1,69 mol) foi adicionado a 5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbonitrila (55 g, 225,18 mmol) em IPA (200 mL) e a mistura foi aquecida a 50°C sob nitrogênio durante 16 horas. A mistura foi esfriada em um banho de gelo. O precipitado resultante foi coletado por meio de filtração, lavado com IPA e dietil éter e seco até um peso constante para se obter (Z)-5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbohidrazonamida (49,2 g, 79%) como um sólido amarelo: Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,45 (9H, s), 5,26 (2H, s), 5,58 (2H, s), 7,56 (2H, s), 8,75 (1H, s); Espectro de Massa [M+H] $^+$ = 277.

[000502] Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (74,3 g, 195,44 mmols) foi adicionado a uma solução de ácido-N-Boc-isonipecótico (41,1 g, 179,15 mmols) e 4-metilmorfolina (35,9 mL, 325,74 mmols) em DMA (800 mL). A mistura foi agitada durante 10 minutos, então, (Z)-5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbohidrazonamida (45 g, 162,87 mmols) foi adicionada à solução em uma porção (exoterma observado a partir de 22°C a 27°C). Após alguns minutos, o produto cristalizou a partir da mistura de reação. A mistura de reação foi removida do recipiente e filtrada através de sinterização. DMA adicional foi adicionado para lavar o produto dos lados do recipiente (150 mL) e este foi vertido sobre o bolo de filtro. Isopropanol (600 mL) foi adicionado ao recipiente e a parte restante do produto no recipiente foi suspensa neste solvente sob agitação vigorosa. A suspensão de isopropanol foi usada para lavar o bolo de filtro uma vez que o DMA foi removido por sucção. O bolo de filtro foi seco por sucção, então, lavado com MTBE e seco por

sucção mais uma vez. O bolo de filtro foi seco *in vacuo* para se obter 4-(2-(amino(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)metileno)hidrazinacarbonil)piperidina-1-carboxilato de (Z)-terc-butila (76 g, 95%) como um sólido amarelo: Espectro de ^1H RMN (DMSO-d₆) 1,40 (9H, s), 1,46 (9H, s), 1,63-1,9 (2H, m), 2,33-2,6 (2H, m, obscurecido pelo sinal de DMSO), 2,63 - 3,03 (2H, m), 3,18-3,48 (4H, m, obscurecido por sinal de água), 3,88-4,11 (2H, m), 6,43 (2H, s), 7,76 (2H, br), 8,84 (0,5H, s), 8,87 (0,5H, s), 9,85 (1H, s): Espectro de Massa [M+H]⁺ = 488.

[000503] Em um preparo alternativo, ácido N-Boc-isonipecótico pode ser feito *in situ* como segue. Ácido Isonipecótico (858g, 3,74 mols) foi dissolvido em DMA (25,3 L) e 4-metilmorfolina (393 mL, 3,74 mols) adicionada. Agitar durante 5 minutos e adicionar cloroformato de isobutila (489 mL, 3,74 mols). A mistura de reação foi agitada a 25°C durante 2h e esfriada para 15°C antes que (Z)-5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazina-2-carbo-hidrazonamida (940 g, 3,4 mols) fosse adicionada aos poucos ao longo de 10 minutos. A mistura de reação foi agitada durante 1-2h a 15°C. Água (20,5 L) foi adicionada aos poucos ao longo de 1h e agitada durante mais 1h antes de ser filtrada. O bolo de filtro foi, então, lavado com água (4 x 4 L) e seco no filtro antes de ser seco em uma estufa a vácuo a 50°C até secar para proporcionar o produto desejado.

[000504] Ácido acético (200 mL) foi adicionado a dioxano (500 mL) em um recipiente duplamente revestido de 3L fixo e a solução foi aquecida a 70°C sob nitrogênio. 4-(2-(amino(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)metileno)hidrazinacarbonil)-piperidina-1-carboxilato de (Z)-terc-butila (74,5 g, 152,80 mmols) foi adicionado aos poucos à mistura quente. Após 10 minutos, a temperatura foi aumentada para 100°C (ligeiro refluxo). A mistura de reação foi agitada a 100°C durante 1,5 horas (suspensão), então, mantida a 80°C 25 du-

rante a noite (solução formada após manter durante a noite). A solução resultante foi concentrada sob pressão reduzida, depois diluída com tolueno, evaporada até secagem, captada em tolueno e concentrada novamente. O óleo residual foi misturado com um pouco de acetato de etila e concentrado até secagem. Um sólido cristalizou a partir da solução, o qual foi triturado com MTBE (200 mL) e isolado por meio de filtração. O bolo de filtro foi lavado com água e MTBE para se obter 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (50 g, 70%) como um sólido cinzento.

[000505] O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida para proporcionar um sólido amarelo. Este material foi triturado com MTBE e filtrado. O bolo de filtração foi lavado com acetato de etila e, então, MTBE para se obter uma segunda safra como um sólido amarelo claro (4,93 g, 7%). Este material era idêntico àquele da primeira safra: Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,17 (9H, s), 1,22 (9H, s), 1,29 -5 1,47 (2H, m), 1,67-1,78 (2H, m), 2,57-2,87 (3H, m), 3,57-3,92 (2H, m), 7,56 (2H, br), 8,56 (1H, s), 13,47 (2H, s largo); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$.

[000506] 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (19,87 mL, 132,90 mmol) foi adicionado a uma suspensão de 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (48 g, 102,23 mmols) em 2-metilTHF (300 mL). Uma solução escura foi obtida após 5 minutos, tratada com carvão e filtrada através de um bloco de celite, lavando o carvão e carvão adicional com 2-metilTHF (100 mL). O filtrado foi agitado com um agitador a ar em uma temperatura de -5°C em um recipiente duplamente revestido de 3 L fixo sob uma atmosfera de nitrogênio. 2-metilTHF (100 mL) foi adicionado para ajudar a agitar a suspensão amarela. Iodometano (7,96 mL, 127,78 mmols) foi adicionado gota a gota ao longo de 15 minutos. A mistura foi agitada durante duas horas e a mistura

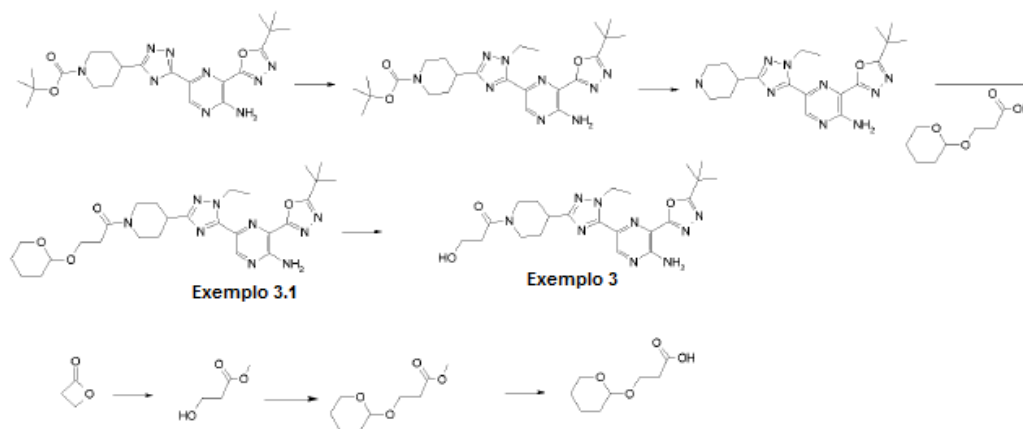
de reação foi aquecida para a temperatura ambiente. Após 16 horas, mais iodometano foi adicionado (6 ml) e DBU (20 mL) foi adicionado e a agitação foi continuada durante 16 horas. A mistura foi vertida em água e agitada durante 5 minutos. O material insolúvel foi isolado na forma de um sólido bege e seco *in vacuo* para proporcionar 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (24,77 g, 50,1%). Os licores de origem foram concentrados sob pressão reduzida e o resíduo foi purificado por meio de cromatografia rápida em coluna de sílica usando MTBE como eluente. Uma segunda safra do produto desejado (13,04 g, 26%) foi, assim, obtida como um sólido amarelo: Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,47 25 (9H, s), 1,51 (9H, s), 1,57-1,76 (2H, m), 1,94-2,1 (2H, m), 2,87-3,09 (3H, m), 3,9-4,08 (2H, m), 4,26 (3H, s), 7,97 (2H, br, s), 8,92 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 484$.

[000507] 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (36,81 g, 76,12 mmols) foi adicionado a uma solução de ácido 2,2,2-trifluoroacético (100 ml, 1305,87 mmols) em DCM (100 mL). A mistura foi agitada durante 3 horas em temperatura ambiente. A mistura foi concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi dissolvido em DCM (1,5 L) e amônia concentrada vigorosamente agitada (150 mL) em água (400 mL) adicionada. A fase aquosa foi lavada com DCM (400 mL) e as soluções orgânicas combinadas foram secas com sulfato de magnésio, filtradas e concentradas até secagem para obter 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (30,0 g, 103%) como um sólido amarelo:

[000508] Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,44 (9H, s), 1,54-1,69 (2H, m), 1,8-1,92 (2H, m), 2,53-2,63 (2H, m), 2,68-2,83 (1H, m), 2,93-3,05 (2H, m), 4,19 (3H, s), 7,89 (2H, br), 8,85 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 384$.

[000509] Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (30,4 g, 80,04 mmols), foi adicionado a uma solução agitada de 3-ácido (tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propanoico (12,67 g, 72,76 mmols) e N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (25,3 mL, 145,52 mmols) dissolvida em acetonitrila (200 mL) a 25°C. A solução resultante foi agitada a 25°C durante 20 minutos e, então, 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (30 g, 72,76 mmols) foi adicionada aos poucos, lavando a última porção na mistura como uma pasta em acetonitrila (100 mL). Após agitação durante 1 hora, o precipitado foi coletado por meio de filtração, lavado com acetonitrila e seco *in vacuo* para se obter 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)-propan-1-ona (35,0 g, 89%) como um sólido bege. O filtrado foi diluído com DCM (600 mL), lavado com água, seco sobre sulfato de magnésio e concentrado. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia rápida em gel de sílica eluindo com um gradiente de amônia a 7 N em metanol com diclorometano a 2 a 2,5%. Uma segunda safra de produto (3,31 g, 6,13 mmol, 8,43%) também foi obtida como um sólido creme. Ambas as amostras foram combinadas para proporcionar um sólido bege: Espectro de ¹H RMN (DMSO-d₆) 1,44 (9H, s), 1,52-1,79 (4H, m), 1,88-2,04 (2H, m), 2,53-2,73 (2H, m), 2,73-2,87 (1H, m), 2,91-3,05 (1H, m), 3,13-3,24 (1H, m), 3,37-3,47 (1H, m), 3,53-3,65 (1H, m), 3,7 -3,8 (1H, m), 3,81-3,89 (1H, m), 3,89-3,99 (1H, m), 4,20 (3H, s), 4,29-4,4 (1H, m), 4,54-4,61 (1H, m), 7,60-8,20 (2H, br), 30 8,85 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 540.

Exemplo 3: 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona



[000510] 4-metilbenzeno-sulfonato de piridina (11,62 g, 46,24 mmols) foi adicionado a uma suspensão de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propan-1-ona (128 g, 231,19 mmols) em metanol (1 L) sob atmosfera de nitrogênio. A mistura foi agitada a 60°C durante 1,5 horas. A mistura era solúvel após 5 minutos. A mistura foi mantida a 50°C durante a noite, tempo durante o qual se formou um precipitado. O material sólido foi isolado por meio de filtração e lavado com água e acetonitrila. Este material ainda continha impurezas menores da fase anterior e foi necessária purificação adicional. O material foi dissolvido em diclorometano e purificado por meio de cromatografia rápida sobre gel de sílica (metanol/DCM a 0% a 10% em metanol/DCM). O produto desejado, 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (Exemplo 3) (92 g, 85%) foi, assim, isolado como um sólido creme (Forma A) : Espectro de ¹H RMN (DMSO-d₆) 1,4-1,51 (12H, m), 1,51-1,78 (2H, m), 1,89-2,05 (2H, m), 2,72-2,86 (1H, m), 2,91-3,05 (1H, m), 3,12-3,24 (1H, m), 3,64 (2H, q), 3,83-4,01 (1H, m), 4,29-4,41 (1H, m), 4,47 (1H, t), 4,58 (2H, q), 8,26 (2H, s), 8,85 (1H, s);

Espectro de ^1H RMN $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$.

[000511] 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propan-1-ona (**Exemplo 3.1**) foi preparado como segue.

[000512] 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (76 mL, 511,14 mmols) foi adicionado a uma suspensão de 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (150 g, 319,46 mmols) em 2-metilTHF (1,2 L). Iodoetano (46 mL, 575,03 mmol) foi adicionado e a mistura foi agitada durante 16 horas a 35°C. Mais iodoetano (46 mL, 575,03 mmols) e 1,8-diazabicyclo[5.4.0]undec-7-eno (76 mL, 511,14 mmol) foram adicionados e a agitação foi continuada durante 24 horas a 35°C. A mistura foi vertida em água e o material insolúvel foi isolado por meio de filtração, lavado com água e MTBE e seco *in vacuo* para proporcionar 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (116 g, 73,0%) como um sólido amarelo. O filtrado foi extraído com DCM e a solução orgânica foi seca com sulfato de magnésio, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia rápida em coluna de sílica usando um gradiente de eluição (MTBE/heptano a 30% em MTBE a 100%). Uma segunda safra do produto desejado (12 g, 24,12 mmol, 7,55%) foi, assim, isolada na forma de um sólido amarelo, a qual foi depois combinada com a primeira safra: Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,41 (9H, s), 1,44 (9H, s), 1,48 (3H, t), 1,52-1,69 (2H, m), 1,87-2,04 (2H, m), 2,79-3,03 (3H, m), 3,86-4,03 (2H, m), 4,59 (2H, q), 7,89 (2H, s), 8,85 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 498$. TFIF também pode ser um solvente adequado para a reação acima.

[000513] TFA (400 mL) foi adicionado aos poucos a uma solução de 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-

1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (126 g, 253,22 mmols) em DCM (400 mL). A mistura foi agitada durante 16 horas em temperatura ambiente. A mistura foi concentrada sob pressão reduzida, dissolvida em DCM (1 L) e adicionada lentamente a uma solução vigorosamente agitada de amônia concentrada aquosa (500 ml) em água a 0°C. A solução orgânica foi separada da fase aquosa e concentrada sob pressão reduzida para se obter 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (101 g, 100%) como um sólido amarelo: Espectro de ¹H RMN (DMSO-d6) 1,4-1,52 (12H, m), 1,57-1,73 (2H, m), 1,83-1,93 (2H, m), 2,57 - 2,7 (2H, m), 2,71-2,84 (1H, m), 2,96-3,09 (2H, m), 4,58 (2H, q), 8,06 (2H, s), 8,84 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 398.

[000514] *Em outro experimento em uma escala similar (cerca de 170 g de material de iniciação), o seguinte procedimento de isolamento foi usado: as camadas foram separadas e a camada superior (emulsão com um sólido) foi filtrada. O sólido foi lavado com DCM (0,5 L) e o filtrado foi transferido para uma ampola de decantação. As camadas foram separadas e a camada aquosa foi extraída com DCM (0,5 L). As camadas orgânicas foram secas sobre MgSO₄, filtradas e concentradas. O produto foi seco a 50°C durante a noite (81,75 g). O sólido da extração foi suspenso em água (200 mL) durante 30 min em temperatura ambiente e filtrado. O produto foi seco a 50°C *in vacuo* (61,8 g).

[000515] Uma outra variação é a seguinte:

uma suspensão de 4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidina-1-carboxilato de terc-butila (3009,5 g, 6,05 mols) em DCM (9L) foi esfriada para 5-10°C sob N₂. TFA (9L) foi adicionado aos poucos à suspensão, mantendo a temperatura <30°C. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante uma hora. A mistura foi concentrada, o resíduo resultante foi dissolvido em água (30 L) e adicionado len-

tamente a uma solução aquosa de amônia a 35% (12L) a 0-5°C. A suspensão foi agitada durante 30 min, então, o produto foi separado por meio de filtração e lavado com água (2 x 6 L). O produto foi seco a 50°C sob vácuo durante 2 dias (2496 g).

[000516] Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (HATU, 106 g, 279,51 mmols), foi adicionado aos poucos a uma solução agitada de ácido 3-(tetra-hidro-2H-piran -2-ilóxi)propanoico (44,3 g, 254,10 mmols) e N,N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (89 mL, 508,21 mmols) dissolvida em acetonitrila (600 mL) a 25°C. A solução resultante foi agitada a 25°C durante 20 min, então, 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (101 g, 254,10 mmols) foi adicionada aos poucos, lavando a última porção na mistura como uma pasta em acetonitrila (300 mL). Após agitação durante 1 hora, o precipitado foi coletado por meio de filtração, lavado com acetonitrila e seco *in vacuo* para se obter 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propan-1-ona (128 g, 91%) como um sólido bege. O filtrado foi diluído com DCM (600 ml), lavado com água, seco sobre sulfato de magnésio e concentrado. O resíduo foi purificado por meio de cromatografia rápida em gel de sílica eluindo com um gradiente de amônia a 7N em metanol com diclorometano a 2 a 2,5%. Uma segunda safra do produto desejado (40 g, 72,2 mmols, 28,4%) foi obtida como um sólido creme, a qual foi combinada com a primeira safra: Espectro de ¹H RMN (DMSO-d₆) 1,29-1,48 (16H, m), 1,48 - 1,75 (4H, m), 1,83-1,99 (2H, m), 2,48-2,68 (2H, m), 2,68-2,79 (1H, m), 2,87-2,99 (1H, m), 3,07-3,19 (1H, m), 3,32-3,42 (1H, m), 3,47-3,6 (1H, m), 3,64-3,75 (1H, m), 3,75-3,84 (1H, m), 3,84-3,95 (1H, m), 4,24-4,39 (1H, m), 4,47-4,6 (3H, m), 7,84 (2H, s), 8,79 (1H, s): Espectro de Massa [M + Na] + = 577.

[000517] Preparo Alternativo:

[000518] A uma solução de ácido 3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propanoico (48,80 g 0,2774 mol) e N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (86,96 mL, 0,4993 mol) em THF (552 mL), adicionar hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (115,73 g, 0,3051 mol) aos poucos em temperatura ambiente sob nitrogênio. A mistura resultante foi agitada durante 10 minutos, então, 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (122,5 g (110,25 g ativa), 0,2774 mol) foi adicionada aos poucos ao longo de uma hora. Após 3,5 h, a mistura foi concentrada e o resíduo foi suspenso em MeCN (275 mL) durante 15 minutos em temperatura ambiente. O produto foi separado por meio de filtração, lavado com MeCN (3 x 110 mL) e seco durante a noite a 50°C sob vácuo. Isto proporcionou 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H 1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propan-1-ona (131,9 g, 96%). Em outro preparo alternativo, HBTU (hexafluorofosfato de O-(benzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio) em THF pode ser usado como agente de acoplamento, em vez de HATU.

Preparo Alternativo do Exemplo 3

[000519] A uma suspensão de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propan-1-ona (131,9 g, 0,2382 mol) em metanol (1045 ml) foi adicionado p-toluenossulfonato de piridínio (11,97 g, 47,7 mmols) sob N₂. A mistura de reação foi agitada a 60°C durante 5,5 h, então, a 50°C durante a noite. A mistura de reação foi esfriada para 0°C e o sólido foi separado por meio de filtração. O produto foi suspenso em água (250 mL) durante 20 min em temperatura ambiente, filtrado, lavado com água (3 x 40 mL) e seco a 50°C *in vacuo*. Isto proporcionou 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-

2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (21,4 g) na forma de Forma A (vide abaixo).

[000520] Os licores de metanol foram concentrados e o sólido resultante foi misturado em água (0,6 L) durante 20 min em temperatura ambiente. O sólido foi isolado por meio de filtração e lavado com água (3x100 mL). O bolo de filtração foi suspenso uma segunda vez em água (0,5 L) durante mais 20 minutos. O produto foi isolado por meio de filtração, lavado com água (100 5 mL) e seco a 50°C *in vacuo*. Isto proporcionou 81,9 g de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (81,9 g) como Forma A.

[000521] Ambas as safras foram combinadas (103,3 g), cultivadas com a Forma B (16,68 g) e suspensas em MeCN (826 mL) em temperatura ambiente durante a noite. Isto proporcionou 117,4 g de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona como um sólido amarelo pálido (117,4 g), Forma B (vide abaixo). Este material foi ainda purificado por meio de suspensão em heptano (7,5 vols rel) durante 1 hora. A mistura foi filtrada, seca no filtro e seca a 50°C em um forno a vácuo durante a noite para proporcionar 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (102.5g) como Forma B.

[000522] A Forma B também pode ser feita por transformando a forma A em pasta em MeCN sem cultura.

[000523] Forma A ou B também pode ser convertida à Forma C da maneira a seguir.

[000524] Uma suspensão de 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona (por exemplo, a Forma B feita através dos processos descritos acima) em IPA (12 vol) foi aquecida em refluxo até

que o sólido dissolvesse. A solução foi filtrada a quente, então, esfriada para a temperatura ambiente. Isto proporcionou 1-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-hidroxiopropan-1-ona como um sólido amarelo claro (99,3 g, 97%) como Forma C.

[000525] A Forma C pode também ser convertida à Forma B como segue.

[000526] Em um frasco com flange de 10 L, a Forma C (377,8 g porção 1) em MIBK (7900 mL) foi aquecida a 110-115°C para proporcionar uma solução. A solução foi deixada esfriar para 97-103°C e imediatamente filtrada para um recipiente de 50 L contendo uma semente da Forma B (0,8 g) em acetonitrila (8220 mL) com agitação a -15°C. Durante a adição, a temperatura no recipiente de 50 L foi mantida entre -15 e 25°C por meio de resfriamento com camisa. Mais três porções do composto dissolvido em MIBK foram adicionadas por meio de um método similar. À suspensão resultante foi adicionada uma semente da Forma B (0,8 g) e a mistura foi, então, agitada a 10-20°C durante a noite. No processo, análise confirmou a forma desejada (Forma B) sem Forma C ou amorfo visível. A mistura foi filtrada e lavada com acetonitrila (3340 mL). O sólido foi seco em uma estufa durante 2 dias (sólido foi quebrado durante secagem em um pó e uma mistura de pequenas grumos de ~ 1 mm a 3-4 mm de tamanho) até obter um peso constante. Rendimento = 1532,8 g (93,5%).

[000527] Ácido 3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propanoico foi preparado como segue.

[000528] A uma solução agitada de metanol (2,4 L) e ácido sulfúrico concentrado (44,4 mL, 832,61 mmols) a 0°C sob nitrogênio foi adicionada, gota a gota, beta-propiolactona (175 mL, 2,78 mols). Esta solução foi deixada agitar em temperatura ambiente durante 2 dias. A mistura de reação foi esfriada para 10°C antes da adição, aos poucos, de

bicarbonato de sódio (145 g, 1,72 mol). A suspensão resultante foi deixada agitar em temperatura ambiente durante 75 minutos. Esta solução foi filtrada, o bolo filtrado foi lavado com metanol (800 mL). O filtrado foi evaporado até um óleo, o qual foi redissolvido em diclorometano (1,2 L) e agitou-se durante 60 minutos antes de nova filtração. Esta solução foi filtrada antes de evaporação para se obter cloridrato de 3-hidroxiopropanoato de metila (219 g, 76%) como um óleo. Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 2,50 (2H, t), 3,63 (3H, s), 3,78 (2H, t).

[000529] P-toluenossulfonato de piridínio (7,65 g, 30,45 mmols) foi adicionado a uma solução límpida de 3-hidroxiopropanoato de metila (63,4 g, 609,00 mmols) e 3,4-di-hidro-2H-pirano (78 mL, 852,60 mmols) em diclorometano (650 mL) em temperatura ambiente sob nitrogênio para proporcionar uma solução turva. Esta foi deixada agitar em temperatura ambiente durante a noite. A mistura de reação foi lavada com água (250 mL) e salmoura (250 mL) antes de secar (MgSO_4) e evaporar até ficar um óleo. Este produto bruto foi purificado por meio de cromatografia rápida sobre sílica, gradiente de eluição de EtOAc em heptano a 15 a 30%. As frações puras foram evaporadas até secagem para proporcionar 3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propanoato de metila (67,7 g, 59,0%) como um óleo incolor: Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 1,47 (4H, dddd), 1,55 - 1,84 (2H, m), 2,55 30 (2H, t), 3,33-3,53 (1H, m), 3,53-3,7 (4H, m), 3,78 (1H, ddd), 3,93 (1H, dt), 4,42 - 4,72 (1H, m); Espectro de ^1H RMN [MH] + = 189.

[000530] O hidróxido de sódio (2M, 349 mL, 697,58 mmols) foi adicionado a uma solução de 3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propanoato de metila (67,68 g, 359,58 mmols) em THF (680 mL) em temperatura ambiente. A mistura de reação foi agitada em temperatura ambiente durante 3 horas. O THF foi removido *in vacuo*, a camada aquosa foi, então, lavada com acetato de etila (260 mL), antes de esfriar para 0°C e acidificação cuidadosa até um pH de 5 mediante a adição de ácido clo-

rídrico (2M). O produto foi extraído com acetato de etila (3 x 250 mL) antes de secar (MgSO₄) e evaporação para proporcionar ácido 3-(tetra-hidro-2H- piran-2-ilóxi)propanoico (57,0 g, 91%) como um óleo límpido. Este material foi dissolvido em acetato de etila (750 mL) e, então, lavado com água (3 x 250 mL) e salmoura (250 mL) para remover o ácido acético remanescente. A solução orgânica foi seca (MgSO₄) e evaporada para proporcionar ácido 3-(tetra-hidro-2H-piran-2-ilóxi)propanoico (45.67g, 72,9%) como um óleo incolor: Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) 1,43-1,67 (4H, m), 1,65-1,95 (2H, m), 2,68 (2H, t), 3,48-3,58 (1H, m), 3,73 (1H, dt), 3,88 (1H, ddd), 4,02 (1H, dt), 4,59-4,7 (1H, m); Espectro de ¹H RMN [M-H]⁻ = 173. Exemplo 3, conforme aqui antes, foi isolado um sólido cristalino em três formas cristalinas diferentes, descritas como Formas A, B e C.

[000531] A estrutura cristalina da Forma A do Exemplo 3 pode ser caracterizada por XRPD e DSC.

[000532] Os métodos para realizar estas técnicas são conforme descrito para o Exemplo 1.

Dez picos de difração de pó por raios X para Exemplo 3, Forma A

Ângulo 2-Teta (2θ)	Intensidade%
4,8	100
10,0	89,2
14,6	81,9
5,2	59,4
19,9	53,6
10,4	49,3
25,4	48,7
23,6	48,6
24,4	43,9
16,2	36,3

[000533] O XRPD para o Exemplo 3, Forma A, é mostrado na Figura 3.

[000534] Análise de DSC do Exemplo 3, Forma A, mostra um endotermia com um início a 27,0°C e um pico a 63,0°C. Outros desvios endotérmicos são vistos com inícios e picos nas seguintes temperaturas: 166,5°C e 168,7°C, 172,2°C e 173,2°C e uma fusão final a 174,8°C e um pico a 175,7°C (Figura 4).

[000535] Assim, a análise DSC mostra que o Exemplo 3, Forma A, é um material solvatado com um início de dessolvatação a cerca de 27,0°C e um pico a cerca de 63,0°C.

[000536] Os espectros de difração de raios X para o Exemplo 3 (Forma A) mostraram que o material era cristalino. Este material tinha um ponto de dessolvatação de 28,0°C (início).

[000537] O Exemplo 3 também pode existir em uma forma polimórfica alternativa, dita aqui como Forma B. Preparo da Forma B foi descrito acima.

[000538] Este material tinha um ponto de fusão de 172,5°C (início).

[000539] Em outro aspecto da invenção, é proporcionado um processo para fazer a Forma B do Exemplo 3 ao misturar uma amostra do Exemplo 3 em acetonitrila. Em um aspecto adicional da invenção, é proporcionado um processo para fazer a Forma B do Exemplo 3 a partir de uma solução da Forma C do Exemplo 3 em MIBK.

Dez picos de difração de pó por raios X para Exemplo 3, Forma B

Ângulo 2-Teta (2θ)	Intensidade%
5,8	100,0
10,9	59,8
11,5	33,8
25,9	18,2
17,3	15,8
24,0	14,1
19,1	13,4
12,9	11,7
24,7	11,1
27,2	9,7

[000540] O XRPD para o Exemplo 3, Forma B, está ilustrado na Figura 5.

[000541] Análise DSC do Exemplo 3, Forma B, mostra um endotermia de fusão com início a 172,5°C e um pico a 174,2° C (Figura 6).

[000542] Assim, a análise DSC mostra que o Exemplo 3 B é um sólido com um início de fusão a cerca de 172,5°C e um pico de ponto de fusão a cerca de 174,2°C.

[000543] O Exemplo 3 também pode existir em uma terceira forma cristalina, dita aqui como Forma C. Um processo para produção da Forma C a partir, por exemplo, de material de Forma B, foi descrito acima através de cristalização a partir de álcool isopropílico (IPA).

[000544] Portanto, em outro aspecto da invenção, é proporcionado um processo para fazer Forma C do Exemplo 3 por meio de cristalização Exemplo 3 a partir de IPA.

[000545] Exemplo 3, Forma C, é caracterizado por fornecer pelo me-

nos um dos seguintes valores 2θ medidos usando radiação CuK α : 6,9 e 12,3. Exemplo 3, Forma C, é caracterizado por fornecer um padrão de difração por raios X substancialmente conforme mostrado na Figura A. Dez picos de Difração de pó por raios X são mostrados abaixo.

Dez picos de difração de pó por raios X para Exemplo 3, Forma C

Ângulo 2-Teta (2θ)	Intensidade%
6,9	40,1
12,3	100,0
10,5	23,8
21,0	67,9
24,6	36,1
13,6	21,4
16,4	19,9
19,6	18,1
20,2	17,5
22,5	18,4

[000546] Análise DSC do Exemplo 3, Forma C, mostra um endoterma de fusão com início a 183,0°C e um pico a 185,6° C (Figura B).

[000547] Assim, análise DSC mostra que o Exemplo 3, Forma C, é um sólido de elevado ponto de fusão com início de fusão em cerca de 183,0°C e um pico em cerca de 185,6°C.

Detalhes das técnicas usadas para análise de Difração de Pó por Raios X da Forma C

[000548] Instrumento analítico: PANalytical Cubix.

[000549] O difratograma de pó de raios X foi determinado colocando uma amostra do material cristalino em um suporte de montagem PANalytical de um único cristal de silício (SSC) e espalhando a amostra

em uma camada fina com o auxílio de uma lâmina de microscópio. A amostra foi centrifugada a 30 rotações por minuto (para melhorar as estatísticas de contagem) e irradiada com raios X gerados por um tubo de focagem longo-fino de cobre operado a 40 kV e 40 mA com um comprimento de onda de 1,5418 angstroms. A fonte de raios X colimada foi passada através de uma fenda Soller de 0,04rad, então, uma divergência variável automática fixada em V20, finalmente, uma máscara de feixe 20 mm. A radiação refletida dirigida através de uma fenda antidispersão de 20 mm e uma fenda Soller de 0,04rad. A amostra foi exposta durante 1,905 segundos por incremento de 0,0025067 °2-teta (modo de varredura contínua) ao longo da faixa de 2 graus a 40 graus 2-teta no modo teta-teta. O instrumento era equipado com um detector X-Celerator. Controle e captura de dados foram por meio de um Dell Pentium 4HT Workstation operando com um software X'Pert Industry. Aqueles versados na técnica de difração de pó por raios X perceberão que a relativa intensidade dos picos pode ser afetada, por exemplo, grãos acima de 30 microns de tamanho e proporções não unitárias que possam afetar a análise de amostras. Aqueles versados na técnica também perceberão que a posição de reflexão pode ser afetada pela altura precisa na qual a amostra fica no difratômetro e a calibração zero do difratômetro. A planaridade da superfície da amostra pode também ter um pequeno efeito. Conseqüentemente, os dados do padrão de difração apresentados não devem ser tomados como valores absolutos.

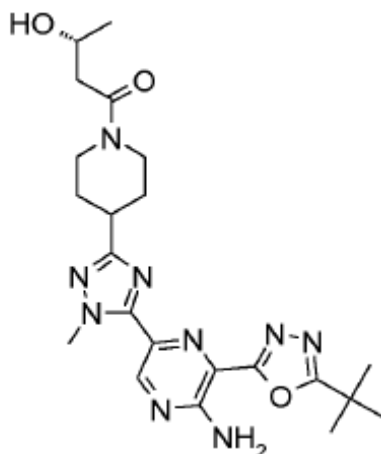
Calorimetria de Varredura Diferencial

[000550] Instrumento analítico: TA Instruments DSC Q1000.

[000551] Tipicamente, menos de 5 mg de material contido em um recipiente de alumínio padrão equipado com uma tampa foram aquecidos ao longo da faixa de temperatura de 25°C a 300°C em uma taxa de aquecimento constante de 10°C por minuto. Um gás de purga usando nitrogênio foi usado em uma taxa de fluxo de 50 ml por minuto.

Exemplo 4:

[000552] (3R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil,1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il-1-piperidil]-3-hidróxi-butan-1-ona

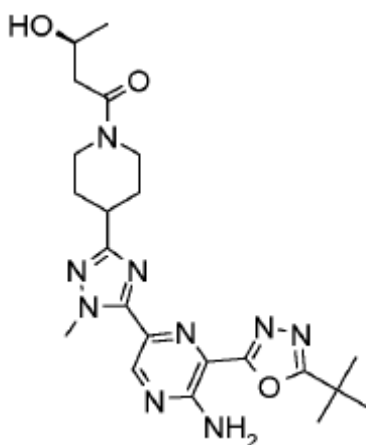


[000553] Tetrafluoroborato de 2-(1H-benzo[d] [1,2,3] triazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilisourônio (201 mg, 0,63 mmol) foi adicionado a uma suspensão agitada de 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (200 mg, 0,52 mmol, descrita no Exemplo 1), N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,273 mL, 1,56 mmol) e ácido (R)-3-hidroxibutanoico (65,2 mg, 0,63 mmol) em N,N-dimetilformamida (3 mL). A suspensão resultante foi agitada em temperatura ambiente durante duas horas. A mistura resultante foi purificada por meio de HPLC preparativa usando uma coluna Waters X-Bridge de fase inversa (C-18, 5 microns, sílica, 30 mm de diâmetro, 150 mm de comprimento, taxa de fluxo de 60 mL/min) usando uma mistura isocrática de acetonitrila a 31% em água (contendo carbonato de amônio (2 g/l). As frações contendo o composto desejado foram evaporadas até secagem para proporcionar um sólido amarelo claro. Este sólido foi agitado em acetonitrila (3 mL) em temperatura ambiente. O sólido resultante foi filtrado, lavado com água gelada, acetonitrila e seco para se obter o composto do título (125 mg, 51,0%) como um sólido amarelo pálido.

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 1,24 (3H, d), 1,52 (9H, s), 1,85 (2H, m),

2,10 (2H, m), 2,35 (1H, dd), 2,55 (1H, d), 2,90 (1H, m), 3,05 (1H, m), 3,20 (1H, m), 3,90 (1H, m), 4,25 (1H, m), 4,31 (3H, s), 4,6 (1H, m), 9,03 (1H, s); Espectro de ^1H RMN $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$.

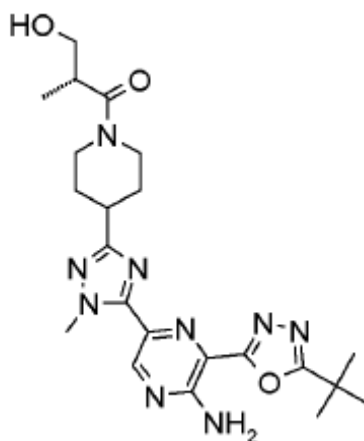
Exemplo 5: (3S)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-butan-1-ona



[000554] Usando um procedimento similar àquele descrito no Exemplo 4, 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina foi reagida com ácido (S)-3-hidroxi-butanoico para se obter o composto do título (167 mg, 68,2%) como um sólido amarelo pálido. Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 1,24 (3H, d), 1,52 (9H, s), 1,85 (2H, m), 2,10 (2H, m), 2,35 20 (1H, dd), 2,55 (1H, d), 2,90 (1H, m), 3,05 (1H, m), 3,20 (1H, m), 3,90 (1H, m), 4,25 (1H, m), 4,31 (3H, s), 4,6 (1H, m), 9,03 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$.

Exemplo 6

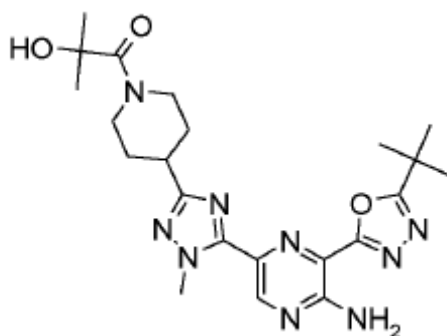
(2R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-2-metil-propan-1-ona



[000555] Usando um procedimento similar àquele descrito no Exemplo 4, 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina foi reagida com ácido (R)-3-hidróxi-2-metilpropanoico para se obter o composto do título (87 mg, 47,4%) como um sólido amarelo pálido.

Espectro de ^1H RMN (CDCl_3) 1,55 (9H, s), 1,61 (3H, s largo), 1,8-2,0 (2H, m), 2,10-2,25 (2H, 10 m), 2,90 (2H, m), 3,10 (1H, m), 3,3 (2H, m), 3,77 (2H, m), 4,33 (3H, s), 4,6 (1H, m), 9,05 (1H, s); Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$.

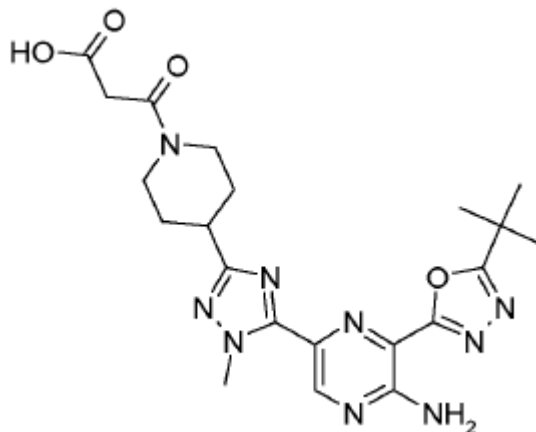
Exemplo 7: 1-[4-[5-[(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-6-(5-amino-1-metil-1,2,4-[5-triazol-3-il]-1-piperidil]-2-hidróxi-2-metil-propan-1-ona



[000556] 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida (100 mg, 0,52

mmol) foi adicionada em uma porção a ácido 2-hidróxi-2-metilpropanoico (38,0 mg, 0,37 mmol), 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (100 mg, 0,26 mmol) e 2-hidróxi-piridina-N-óxido (57,9 mg, 0,52 mmol), dissolvido em NMP (1,2 mL) sob atmosfera de argônio. A solução resultante foi agitada a 25°C durante 3 horas. Piridina (100 µL, 1,24 mmol) foi adicionada e a mistura foi agitada durante 18 horas. Mais 1-óxido de 2-hidroxipiridina (57,9 mg, 0,52 mmol) e 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida (100 mg, 0,52 mmol) foram adicionados. A mistura foi, então, aquecida para 70°C durante 48 horas, mais ácido 2-hidróxi-2-metilpropanoico (15 mg, 0,14 mmol), 1-(3-dimetilaminopropil)-3-etilcarbodi-imida (50,0 mg, 0,26 mmol) e 1-óxido de 2-hidroxipiridina (25,0 mg, 0,23 mmol) foram adicionados e a mistura foi, então, mantida a 70°C durante 8 horas. A solução foi purificada por meio de HPLC preparativa usando uma coluna de fase reversa Waters X-Bridge (C-18, 5 microns, sílica, 19 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento, taxa de fluxo de 40 ml/minuto) e misturas decrescentemente polares de água contendo carbonato de amônio (0,2%) e acetonitrila como eluente para se obter o composto do título (71 mg, 58%) como um sólido amarelo claro. Espectro de ¹H RMN (CDCl₃) 1,55 (15H, s lg), 1,90 (2H, m), 2,15 (2H, m), 3,05-3,3 (4H, m), 4,32 (3H, s), 4,6 (1H, m), 9,03 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 470.

Exemplo 8: Ácido 3-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-oxo-propanoico

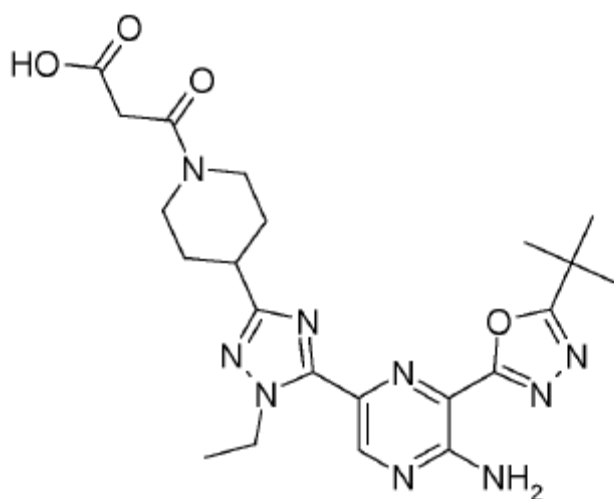


[000557] 3-cloro-3-oxopropanoato de etila (0,037 mL, 0,29 mmol) foi adicionado gota a gota a uma solução agitada de 3-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-metil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (100 mg, 0,26 mmol) e trietilamina (0,047 mL, 0,34 mmol) dissolvida em CH₂Cl₂ (1,5 mL) ao longo de um período de 2 minutos a 0°C sob nitrogênio. A mistura foi agitada a 0°C durante 10 minutos e, então, deixada aquecer para a temperatura ambiente e agitada durante 1 hora. A mistura foi evaporada, dissolvida em DMF. O sólido branco foi filtrado e o filtrado foi purificado por meio de HPLC preparativa usando uma coluna de fase reversa Waters X-Terra eluindo com uma mistura de água (contendo carbonato de amônio a 0,2%) e acetonitrila para se obter 3-(4-(5-(5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-metil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-oxopropanoato de etila (80 mg, 61,7%) como um sólido amarelo. Este material foi suspenso em THF (2 mL). Hidróxido de sódio a 2N (0,235 mL, 0,47 mmol) e água (0,5 mL) foram adicionados. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante a noite. Ácido clorídrico a 2N (230 µL) foi adicionado à mistura. Os solventes foram evaporados. O resíduo foi diluído com CH₂Cl₂ (30 mL) e água (5 mL). A fase orgânica foi lavada com salmoura e seca sobre MgSO₄. Os solventes foram

evaporados. A espuma resultante foi triturada em éter. O sólido amarelo resultante foi filtrado, seco, triturado em acetonitrila (3 mL). O sólido amarelo foi coletado por meio de filtração, seco a 40°C para proporcionar o composto do título (50 mg, 68%) como um sólido amarelo.

Espectro de ^1H RMN (DMSO- d_6) 1,46 (9H, s), 1,58 (1H, m), 1,74 (1H, m), 1,98 (2H, m), 2,84 (1H, m), 3,0 (1H, m), 3,21 (1H, m), 3,46 (2H, m), 3,83 (1H, m), 4,22 (3H, s), 4,34 (1H, m), 7,8-8,2 (1H, m), 8,87 (1H, s);
Espectro de Massa $[\text{M}+\text{H}]^+ = 470$.

Exemplo 9: Ácido 3-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-oxo-propanoico



[000558] Hexafluorofosfato de O-(7-azabenzotriazol-1-il)-N,N,N',N'-tetrametilurônio (474 mg; 1,25 mmol) foi adicionado durante 30 segundos, aos poucos, a uma solução agitada de ácido 3-etóxi-3-oxopropanoico (150 mg, 1,13 mmol), N-etil-N-isopropilpropan-2-amina (0,394 mL, 2,26 mmols) e 3-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (450 mg, 1,13 mmol) dissolvida em DMF (20 mL) a 50°C. A solução resultante foi coletada após 1 min (reação completa) e imediatamente deixada esfriar para a temperatura ambiente. A mistura de reação foi concentrada e diluída com EtOAc (100 mL) e lavada sequencialmente com água (20 ml) e salmoura saturada (20 mL). A camada orgânica foi seca sobre

MgSO₄, filtrada e evaporada para se obter o 3-(4-(5-(5-amino-6-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-oxopropanoato de etila bruto (850 mg).

[000559] Um pouco do material (780 mg) foi dissolvido em THF (20 mL). A esta solução foram adicionados hidróxido de sódio aquoso a 2N (2,3 ml, 4,57 mmols) e água (5 ml), seguido de metanol (5 ml), para proporcionar uma solução límpida. A mistura foi agitada em temperatura ambiente durante 3 horas. O THF foi evaporado. A camada aquosa foi acidificada para um pH de 3 com ácido clorídrico aquoso a 2N (2,5 ml). Diclorometano (50 ml) foi adicionado e a fase orgânica extraída. A fase orgânica foi lavada com salmoura (10 ml) e seca sobre MgSO₄. Os solventes foram evaporados. A goma resultante foi purificada por meio de HPLC preparativa (coluna X-Bridge Waters Prep C18 OBD, 5 µ, sílica, 50 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento), usando misturas decrescentemente polares de água (contendo amônia a 1%) e acetonitrila como eluentes. As frações contendo o composto desejado foram evaporadas até secagem para se obter o sal de amônio puro. Este foi solubilizado em água e acidificado para um pH de 3 com ácido clorídrico a 2 N (~ 0,3 mL). Diclorometano (50 mL) foi adicionado e a fase orgânica separada, lavada com salmoura (5 ml) e seca sobre MgSO₄. Após filtração, a solução resultante foi evaporada até secagem e o resíduo foi triturado com dietil éter (5 mL) e filtrado para se obter ácido 3-(4-(5-(5-amino-6-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il)-3-oxopropanoico (195 mg, 26,5%) como um sólido creme. Espectro de ¹H RMN (DMSO-d₆) 1,45 (9H, s), 1,48 (3H, m), 1,55-1,62 (1H, m), 1,70 -25 1,80 (1H, m), 1,95-2,05 (2H, m), 2,80-2,90 (1H, m), 2,95-3,05 (1H, m), 3,15-3,25 (1H, m), 3,45 (2H, s), 3,78-3,85 (1H, m), 4,30-4,40 (1H, m), 4,55-4,65 (2H, m), 7,80 -8,00 (2H, s largo), 8,88 (1H, s), 12,60 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 484.

Exemplo 10: (2S)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2,3-di-hidróxi-propan-1-ona

[000560] A uma mistura de 3-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina (257 mg, 0,50 mmol, sal de TFA), (S)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de potássio (101 mg, 0,55 mmol) e EDCI (105 mg, 0,55 mmol) em DCM (5 mL) foram adicionados hidrato de 1-hidróxi-1H-benzotriazol (85 mg, 0,56 mmol) e DIPEA (194 mg, 1,50 mmol). A mistura foi agitada durante 16 horas em temperatura ambiente. Água foi adicionada à mistura e a mistura foi extraída com DCM. As camadas orgânicas foram lavadas com salmoura e secas sobre Na₂SO₄, filtradas e concentradas para proporcionar (S)-(4-(5-(6-amino-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il) (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il) metanona (320 mg). Espectro de Massa [M+H]⁺ = 526. A uma mistura de (S)-(4-(5-(5-amino-6-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il)-1-etil-1H-1,2,4-triazol-3-il)piperidin-1-il) (2,2-dimetil-1,3-dioxolan-4-il) metanona (320 mg) em DCM (10 mL) em temperatura ambiente, foi adicionado gota a gota TFA (1,6 ml, 20,77 mmol). A mistura foi agitada durante 16 h em temperatura ambiente, concentrada e purificada por meio de HPLC preparativa (coluna Waters XBridge Prep C18 OBD, 5 μ, sílica, 19 mm de diâmetro, 100 mm de comprimento) usando misturas decrescentemente polares de água (contendo NH₃ a 0,1%) e MeCN como o eluente. As frações contendo o composto desejado foram evaporadas até secagem para se obter o composto do título (142 mg, 48%) como um sólido branco. Espectro de ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 30°C): 1,45 (12H, m), 1,56 (1H, m), 1,70 (1H, m), 1,98 (2H, m), 2,85 (1H, m), 3,00 (1H, m), 3,20 (1H, m), 3,45 (1H, s), 3,55 (1H, s), 4,05 (1H, m), 4,35 (2H, m), 4,60 (2H, m), 4,70 (1H, m), 4,85 (1H, m), 7,90 (2H, m), 8,85 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 486.

Exemplo 11: (2R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2,3-di-di-hidróxi-propan-1-ona

[000561] 3-(5-(terc-butil)-1,3,4-oxadiazol-2-il)-5-(1-etil-3-(piperidin-4-il)-1H-1,2,4-triazol-5-il)pirazin-2-amina foi reagida com (R)-2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-carboxilato de potássio usando um procedimento similar àquele descrito no Exemplo 10 para proporcionar o composto do título (0,145 g, 40%) como um sólido. Espectro de ¹H RMN (400 MHz, DMSO-d₆, 30°C): 1,45 (12H, m), 1,60 (2H, m), 1,98 (2H, m), 2,85 (1H, m), 3,00 (1H, m), 3,17 (1H, m), 3,45 (1H, s), 3,55 (1H, s), 4,05 (1H, m), 4,35 (2H, m), 4,60 (2H, m), 4,70 (1H, m), 4,85 (1H, m), 7,90 (2H, m), 8,85 (1H, s); Espectro de Massa [M+H]⁺ = 486.

Breve Descrição das Figuras

[000562] A Figura 1 mostra um padrão de difração de pó por raios X para o Exemplo 1, Forma A.

[000563] A Figura 2 mostra um termograma de DSC para o Exemplo 1, Forma A.

[000564] A Figura 3 mostra um padrão de difração de pó por raios X para o Exemplo 3, Forma A.

[000565] A Figura 4 mostra um termograma de DSC para o Exemplo 3, Forma A.

[000566] A Figura 5 mostra um padrão de difração de pó por raios X para o Exemplo 3, Forma B.

[000567] A Figura 6 mostra um termograma de DSC para o Exemplo 3, Forma B.

[000568] A Figura 7 mostra um padrão de difração de pó por raios X para o Exemplo 3, Forma C.

[000569] A Figura 8 mostra um termograma de DSC para o Exemplo 3, Forma C.

[000570] A Figura 9 mostra a inibição de crescimento de tumor pelo

Exemplo 3 em combinação com inibidor de AKT (AZD5363)- administração sequencial

[000571] A Figura 10 mostra a inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com inibidor de AKT (AZD5363), coadministração.

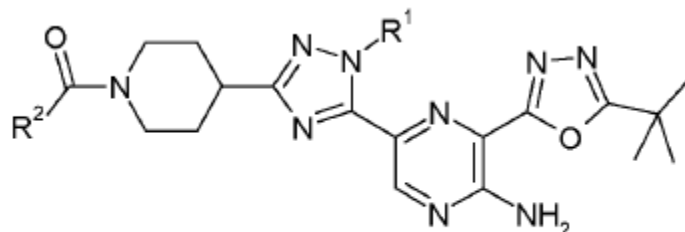
[000572] A Figura 11 mostra a inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com inibidor de PARP (Olaparibe) no modelo de xenoenxerto BT474.

[000573] A Figura 12 mostra a inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com inibidor de PARP (Olaparibe) no modelo de xenoenxerto MCF7.

[000574] A Figura 13 mostra a inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com (AZD8186).

REIVINDICAÇÕES

1. Composto de Fórmula (I):



(I)

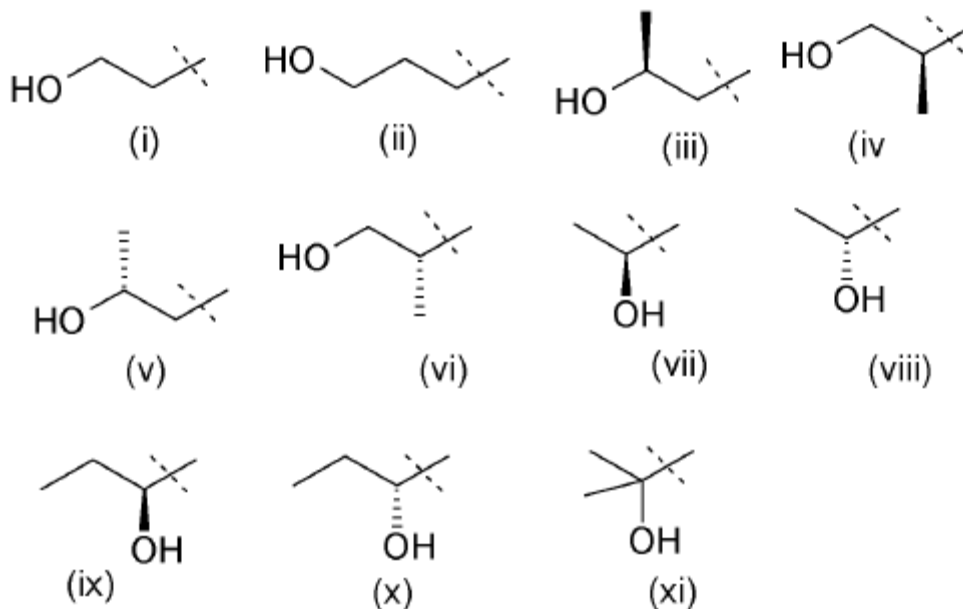
caracterizado pelo fato de que:

R^1 é metila ou etila; e

R^2 é (C2-3) alquila substituída por hidróxi;

ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

2. Composto ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo de acordo com a reivindicação 1, caracterizado pelo fato de que R^2 é selecionado dos grupos (i) a (xi):



3. Composto de acordo com a reivindicação 1 ou 2, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R^2 é selecionado dos grupos (i) a (vi), como definido na reivindicação 2.

4. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R² representa um grupo (i), como definido na reivindicação 2.

5. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R¹ é metila.

6. Composto de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de que R¹ é etila.

7. Composto de acordo com a reivindicação 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser selecionado a partir de:

1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona;

1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona;

(3R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-butan-1-ona;

(3S)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-butan-1-ona;

(2R)-1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-2-metil-propan-1-ona;

1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-metil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-2-hidróxi-2-metil-propan-1-ona.

8. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona, ou um sal

farmaceuticamente aceitável do mesmo.

9. Composto de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por ser 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona;

10. Composto de acordo com as reivindicações 1 a 9, ou um sal farmaceuticamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de estar em uma forma cristalina.

11. Forma cristalina do composto 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona (forma A) caracterizada pelo fato de que possui uma difração de raio-X com picos específicos de aproximadamente 2-theta= 4,8°, 5,2°, 10,0°, 10,4°, 14,6°, 16,2°, 19,9°, 23,6°, 24,4° e 25,4° em que ditos valores podem ser mais ou menos 0,2° 2-theta, conforme medido utilizando radiação CuK α , e adicionalmente possuindo uma endoterma inicial de Calorimetria de Varredura Diferencial com um início a 27,0°C e um pico a 63,0°C.

12. Forma cristalina do composto 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona (forma B), caracterizada pelo fato de que possui uma difração de raio-X com picos específicos de aproximadamente 2-theta= 5,8°, 10,9°, 11,5°, 12,9°, 17,3°, 19,1°, 24,0°, 24,7°, 25,9° e 27,2° em que ditos valores podem ser mais ou menos 0,2° 2-theta, conforme medido utilizando radiação CuK α , e adicionalmente possuindo uma endoterma de Calorimetria de Varredura Diferencial com um início a 172,5°C e um pico a 174,2°C.

13. Forma cristalina do composto 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona (forma C), caracterizada pelo fato de que possui uma difração de raio-X com pelo menos dois picos específicos de aproximadamente 2-theta= 6,9°, 10,5°, 12,3°, 13,6°, 16,4°, 19,6°, 20,2°,

21,0°, 22,5° e 24,6° em que ditos valores podem ser mais ou menos 0,2° 2-theta, conforme medido utilizando radiação CuK α , e adicionalmente possuindo uma endoterma de Calorimetria de Varredura Diferencial com um início a 183,0°C e um pico a 185,6°C.

14. Composto de acordo com as reivindicações 1 a 13, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato de ser para uso como um medicamento.

15. Uso do composto de fórmula (I) de acordo com a reivindicação 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo, caracterizado pelo fato do uso ser na fabricação de um medicamento para prevenção ou no tratamento de câncer em um animal de sangue quente, tal como o homem.

16. Uso do composto de fórmula (I) de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato do composto ser 1-[4-[5-[5-amino-6-(5-terc-butil-1,3,4-oxadiazol-2-il)]pirazin-2-il]-1-etil-1,2,4-triazol-3-il]-1-piperidil]-3-hidróxi-propan-1-ona ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo.

17. Uso do composto de fórmula (I) de acordo com a reivindicação 15, caracterizado pelo fato de o câncer ser câncer de mama.

18. Combinação adequada para uso no tratamento de câncer, caracterizada pelo fato de compreender um composto de Fórmula (I) como definido na reivindicação 1, ou um sal farmacologicamente aceitável do mesmo e outro agente antitumor selecionados dentre AZD2014, AZD8186, AZD5363 ou olaparibe.

19. Composição farmacêutica caracterizada pelo fato de compreender um composto de Fórmula (I) ou um sal farmacêuticamente aceitável do mesmo, como definido na reivindicação 1, e um diluente ou veículo farmacêuticamente aceitável.

20. Uso de um composto de Fórmula (I), caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para tratar um paciente

sofrendo de câncer, em que o paciente é selecionado para o tratamento com um composto de fórmula (I) se uma amostra do paciente contendo DNA derivado de tumor ou células tumorais foi fornecida e o gene de PIK3CA no DNA derivado de tumor ou nas células tumorais do paciente foi determinado como sendo do tipo selvagem ou mutante.

21. Uso de um composto de Fórmula (I) conforme definido na reivindicação 1, caracterizado pelo fato de ser na preparação de um medicamento para o tratamento de cânceres com células tumorais identificadas como portando um gene de PIK3CA mutante.

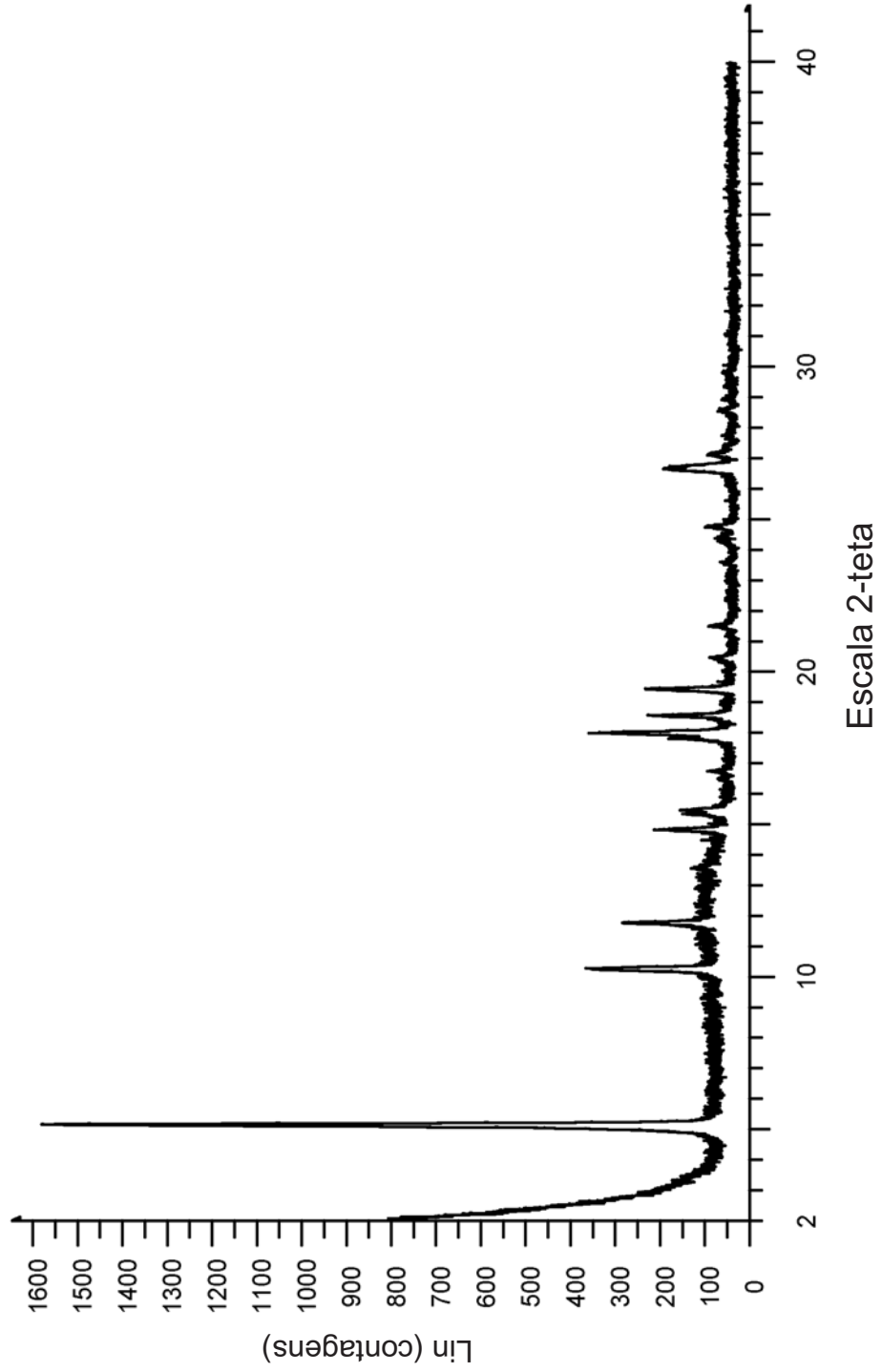


Figura 1: Padrão de difração de pó por raios X, Exemplo 1, Forma A

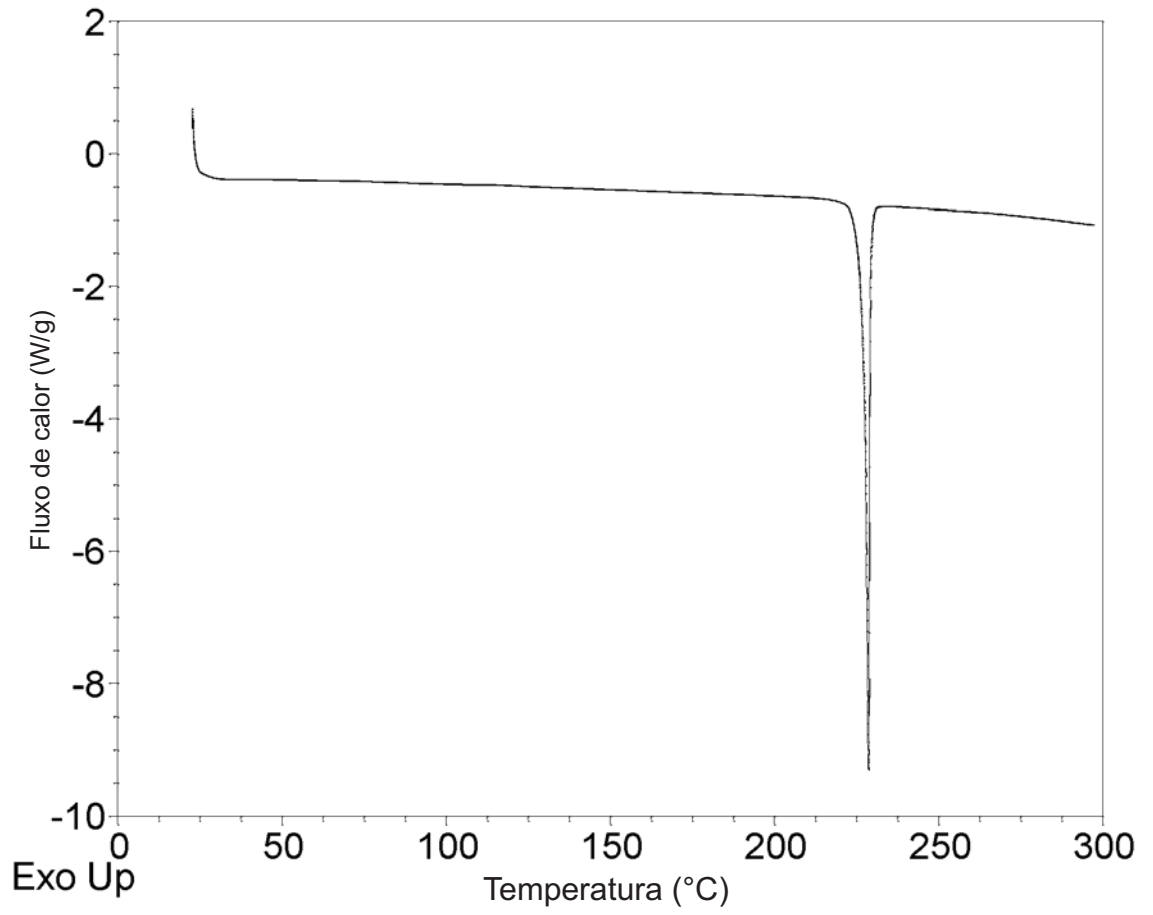


Figura 2: Termograma de DSC do Exemplo 1, Forma A

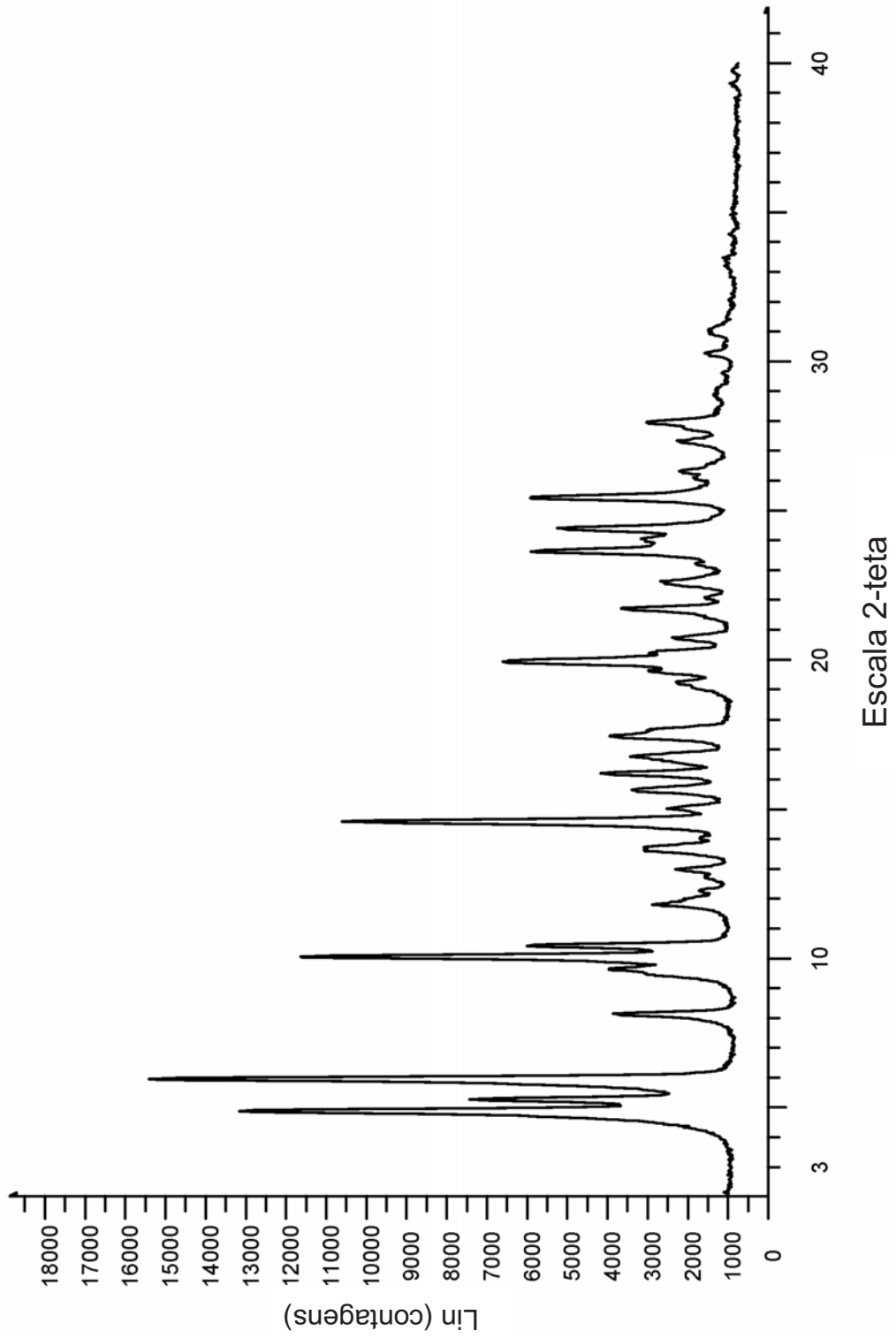


Figura 3: Padrão de difração de pó por raios X, Exemplo 3, Forma A

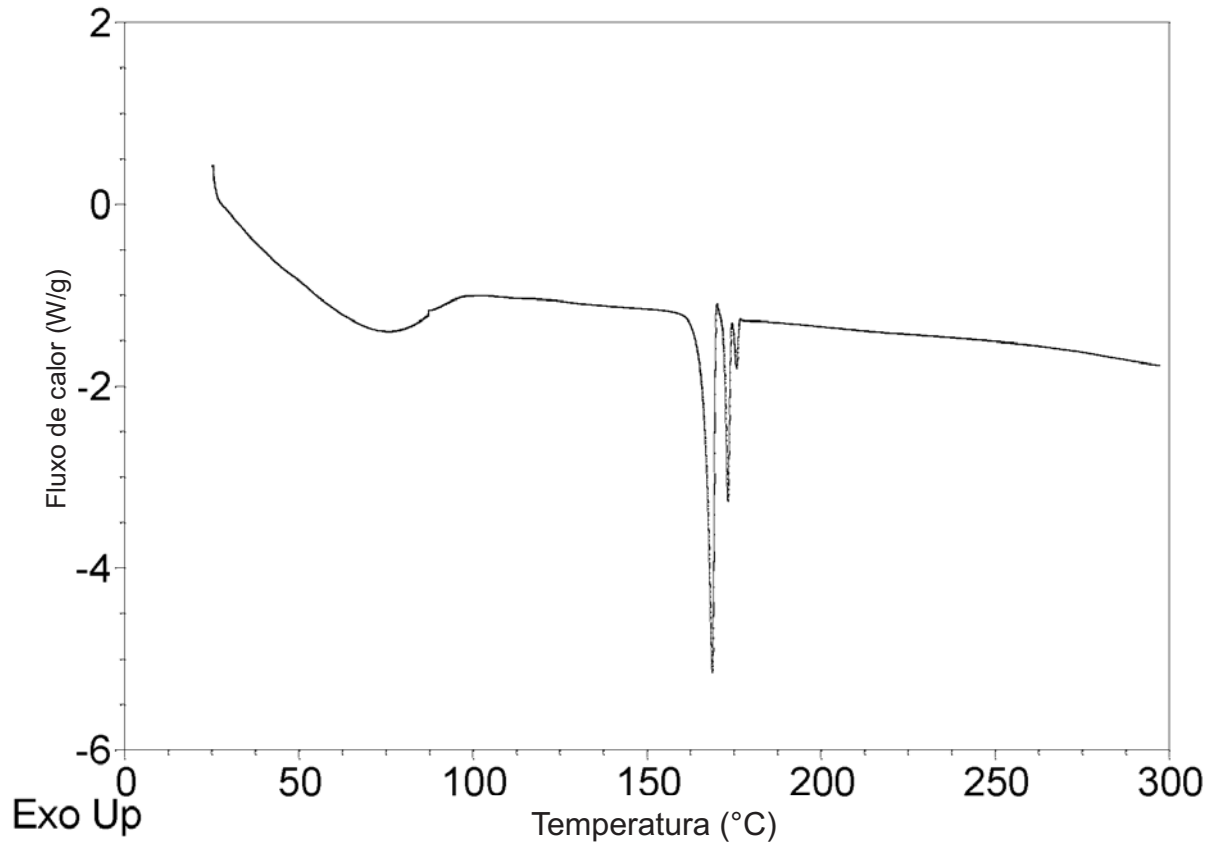


Figura 4: Termograma de DSC do Exemplo 3, Forma A

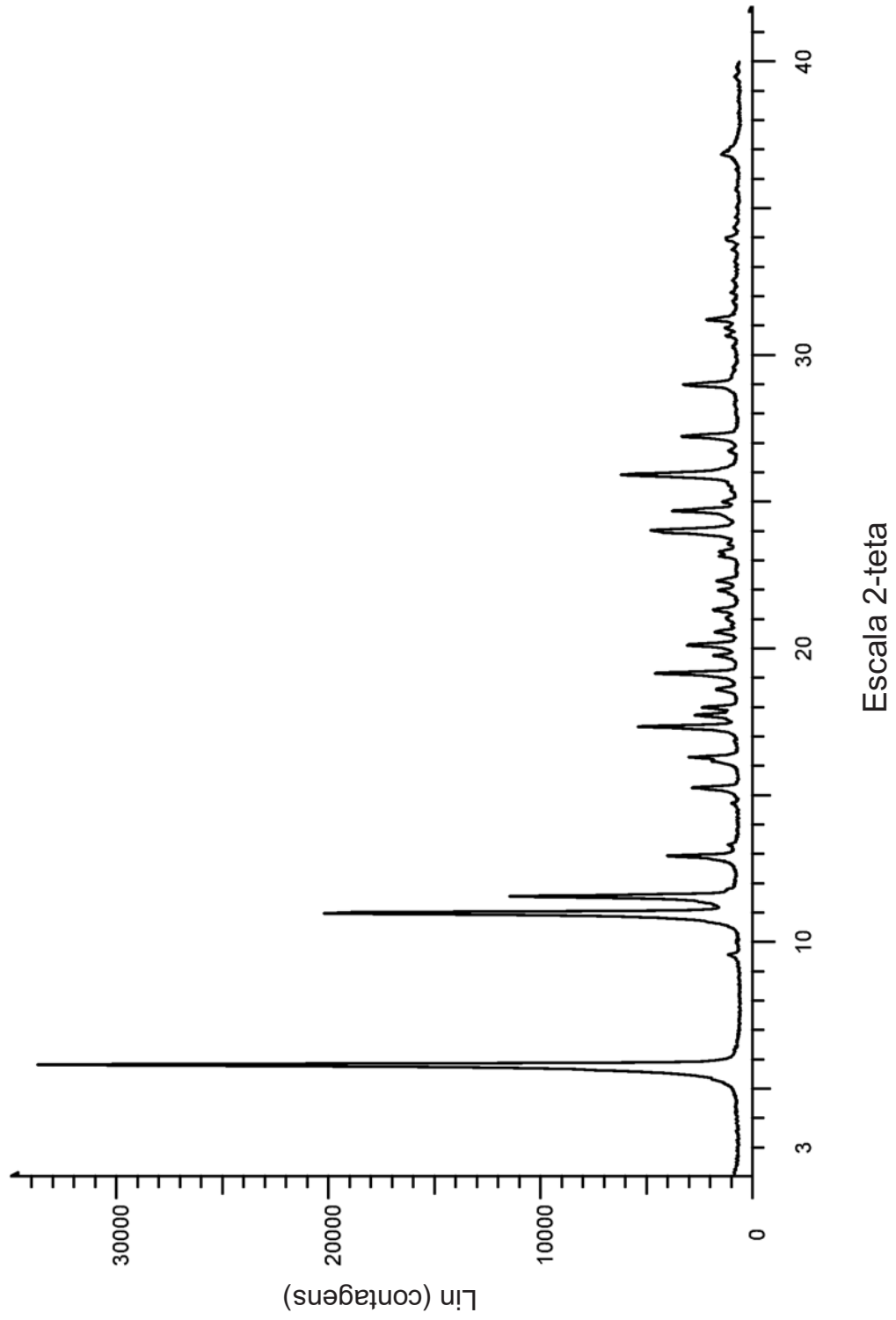


Figura 5: Padrão de difração de pó por raios X, Exemplo 3, Forma B

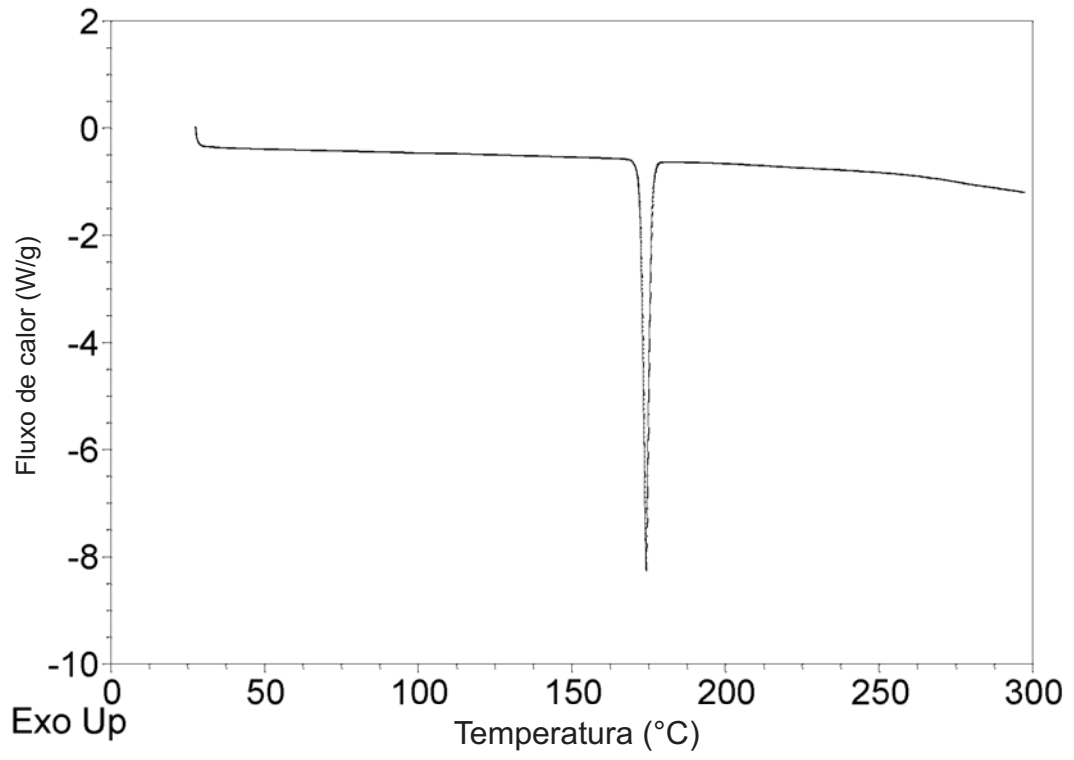


Figura 6: Termograma de DSC do Exemplo 3, Forma B

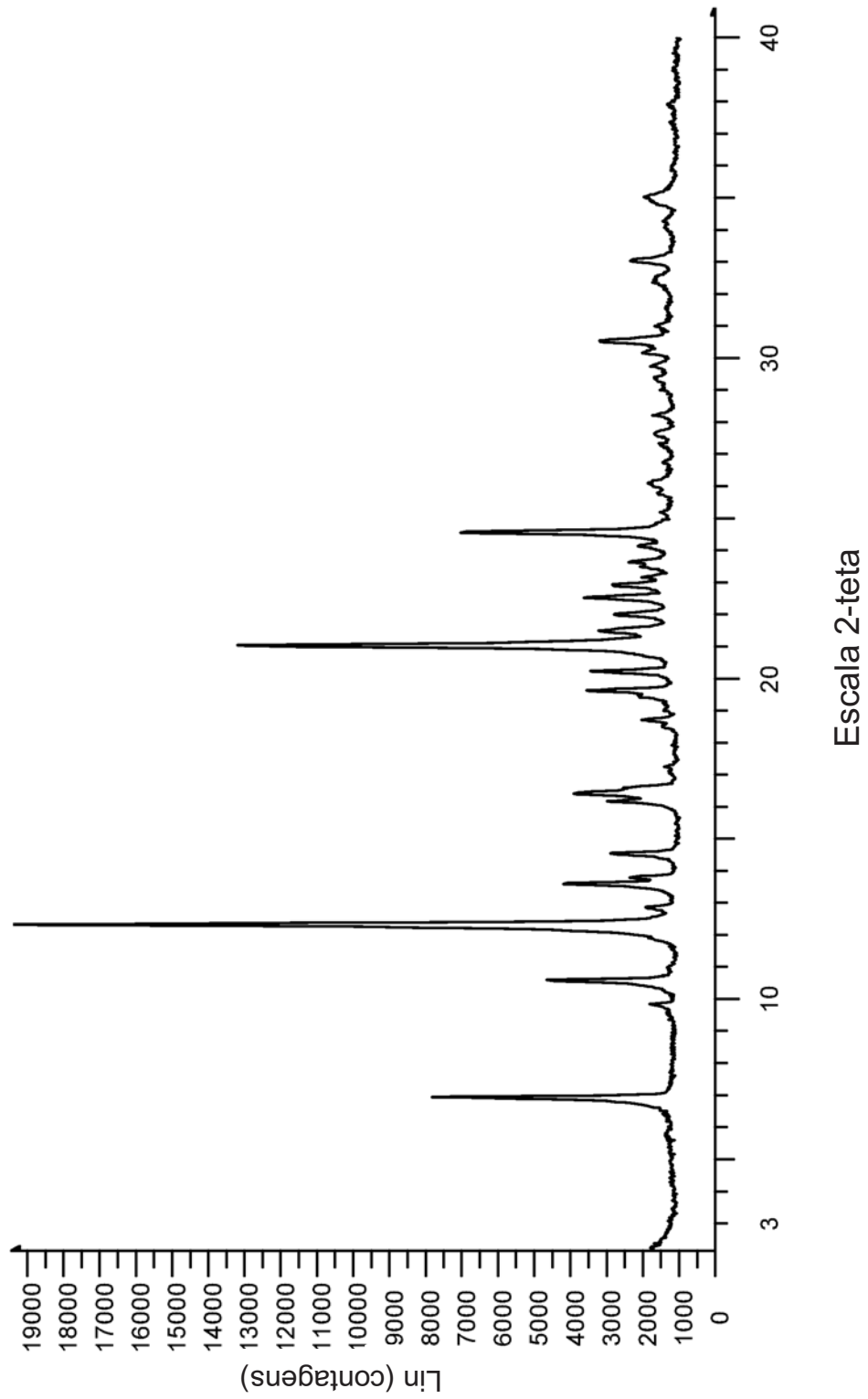


Figura 7: Padrão de difração de pó por raios X, Exemplo 3, Forma C

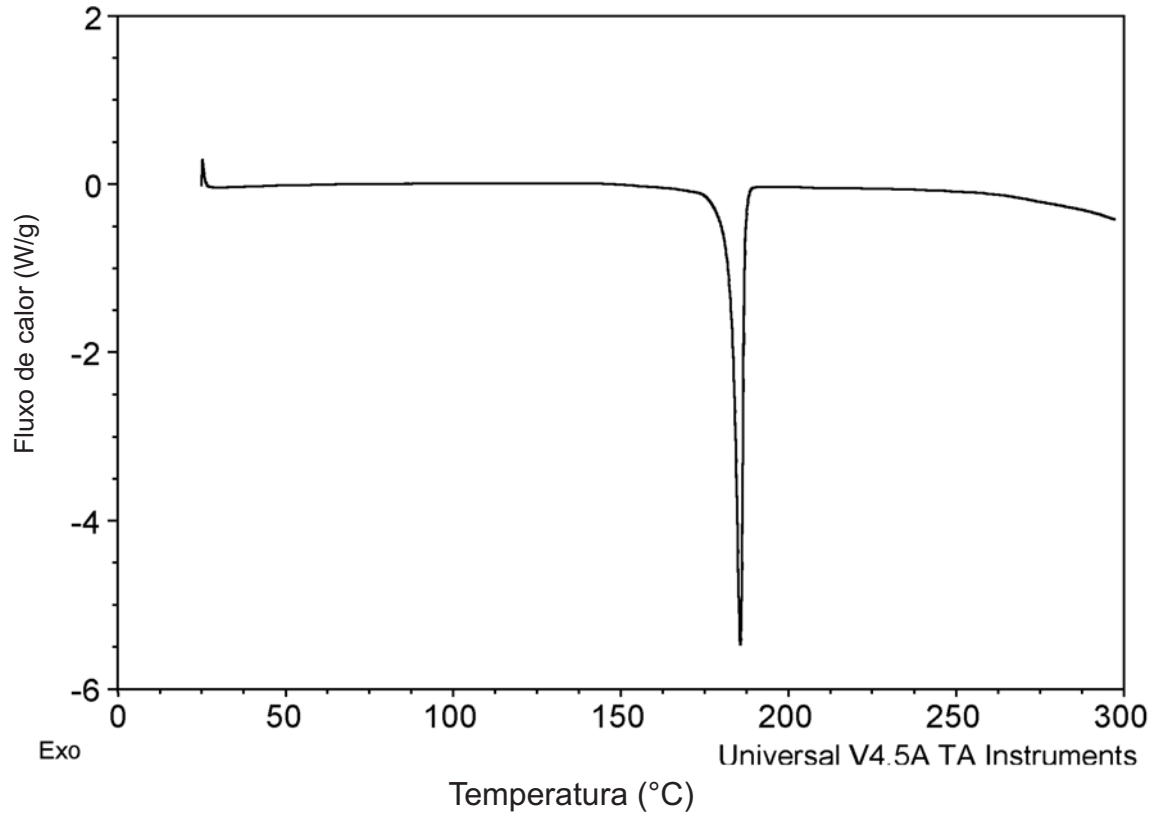


Figura 8: Termograma de DSC do Exemplo 3, Forma C

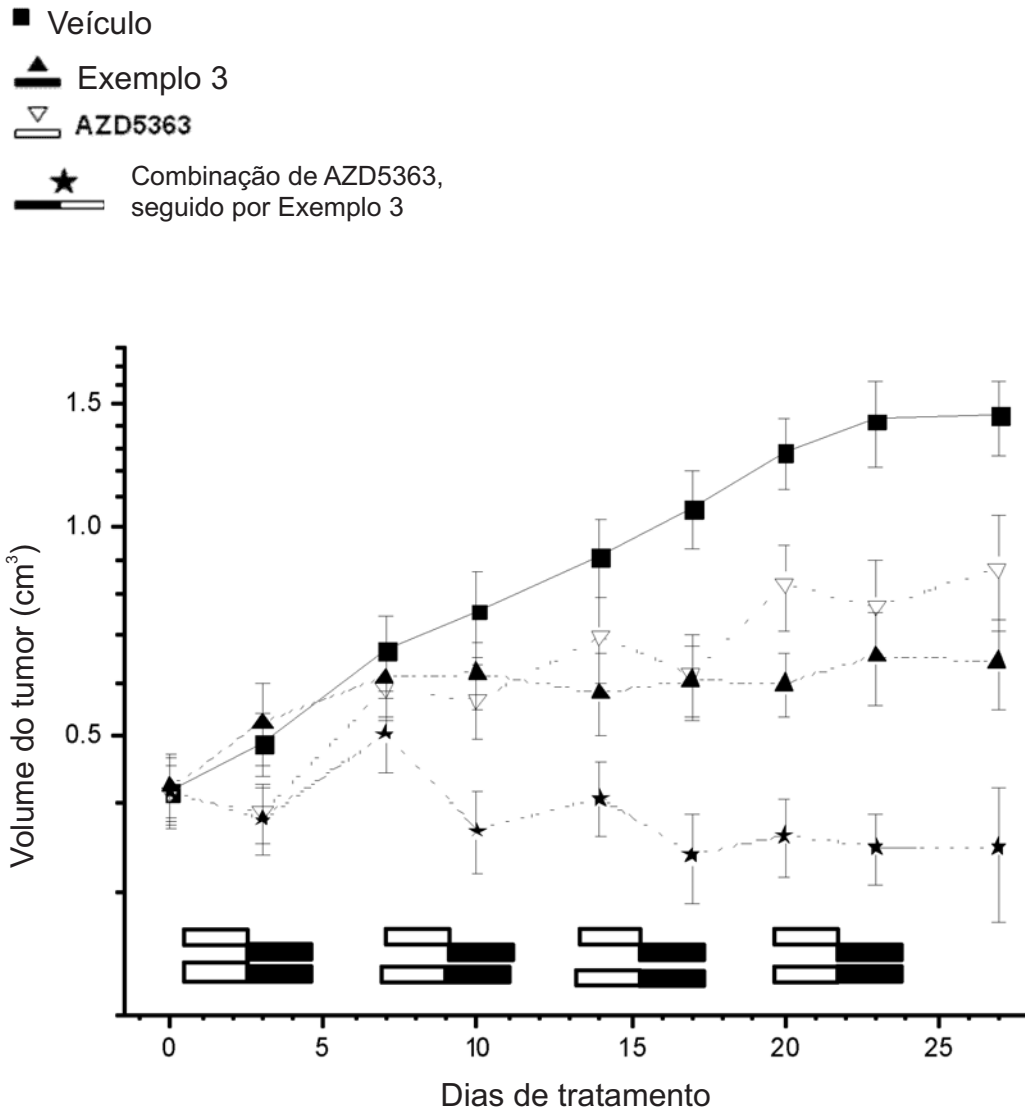


Figura 9: Inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com inibidor de AKT (AZD5363), administração sequencial

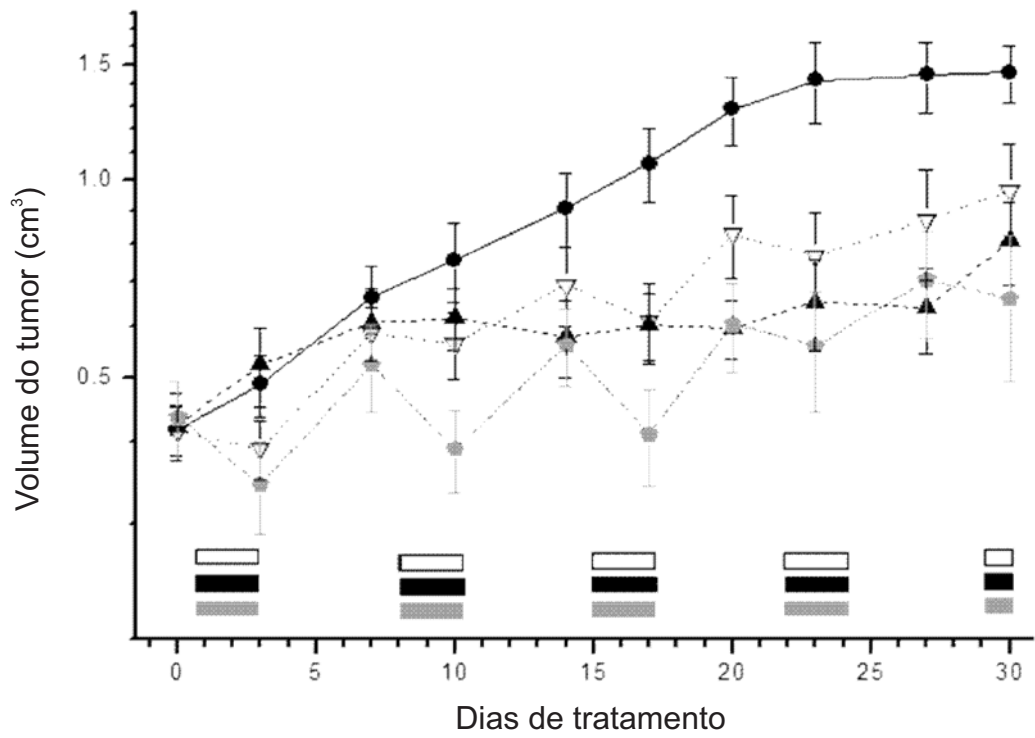
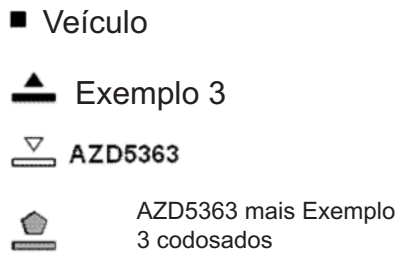


Figura 10: Inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com inibidor de AKT (AZD5363), administração sequencial

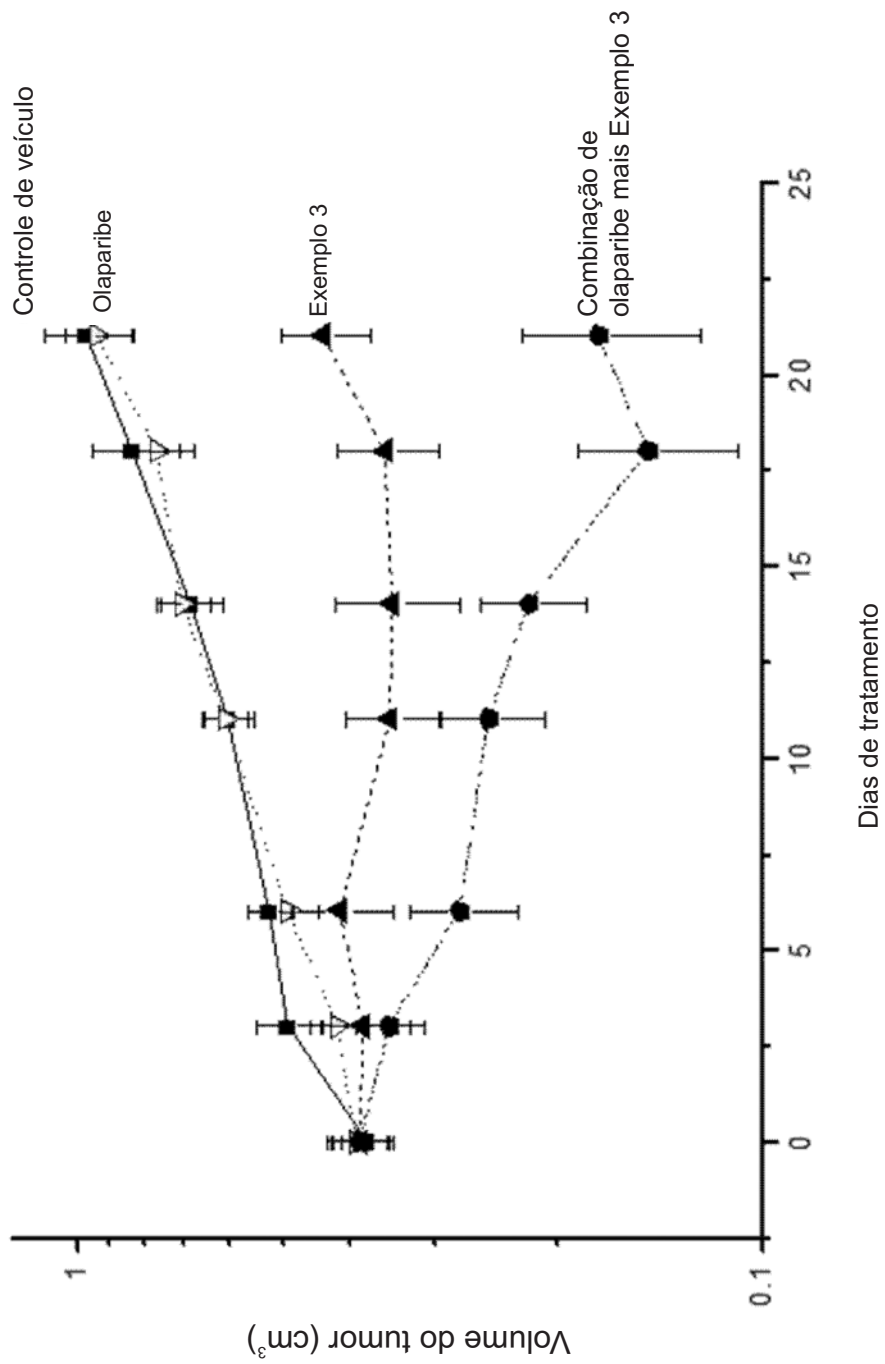


Figura 11: Inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com inibidor de PARP (Olaparibe) no modelo de xenoinxerto BT474

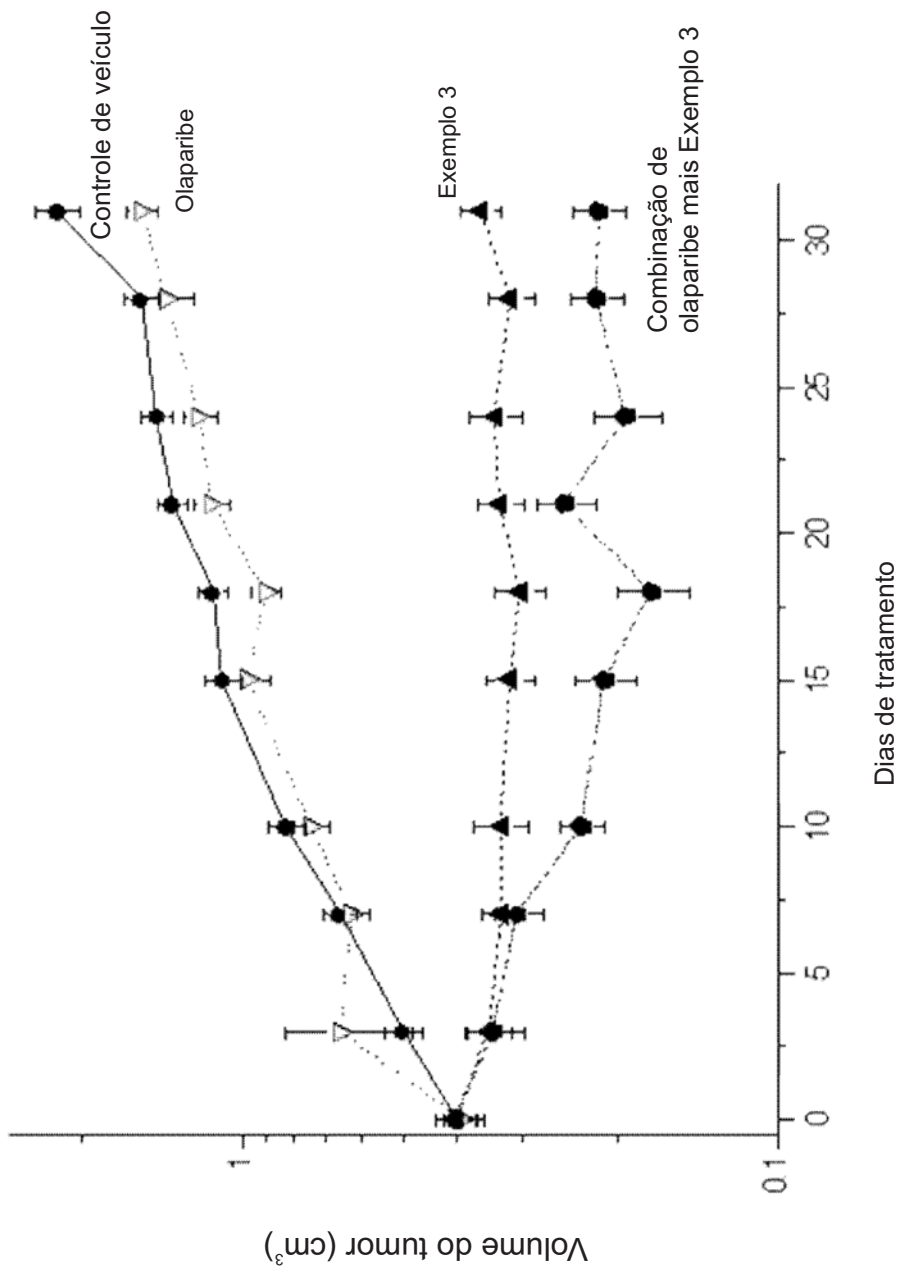


Figura 12: Inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com inibidor de PARP (Olaparibe) no modelo de xenoenxerto MCF7

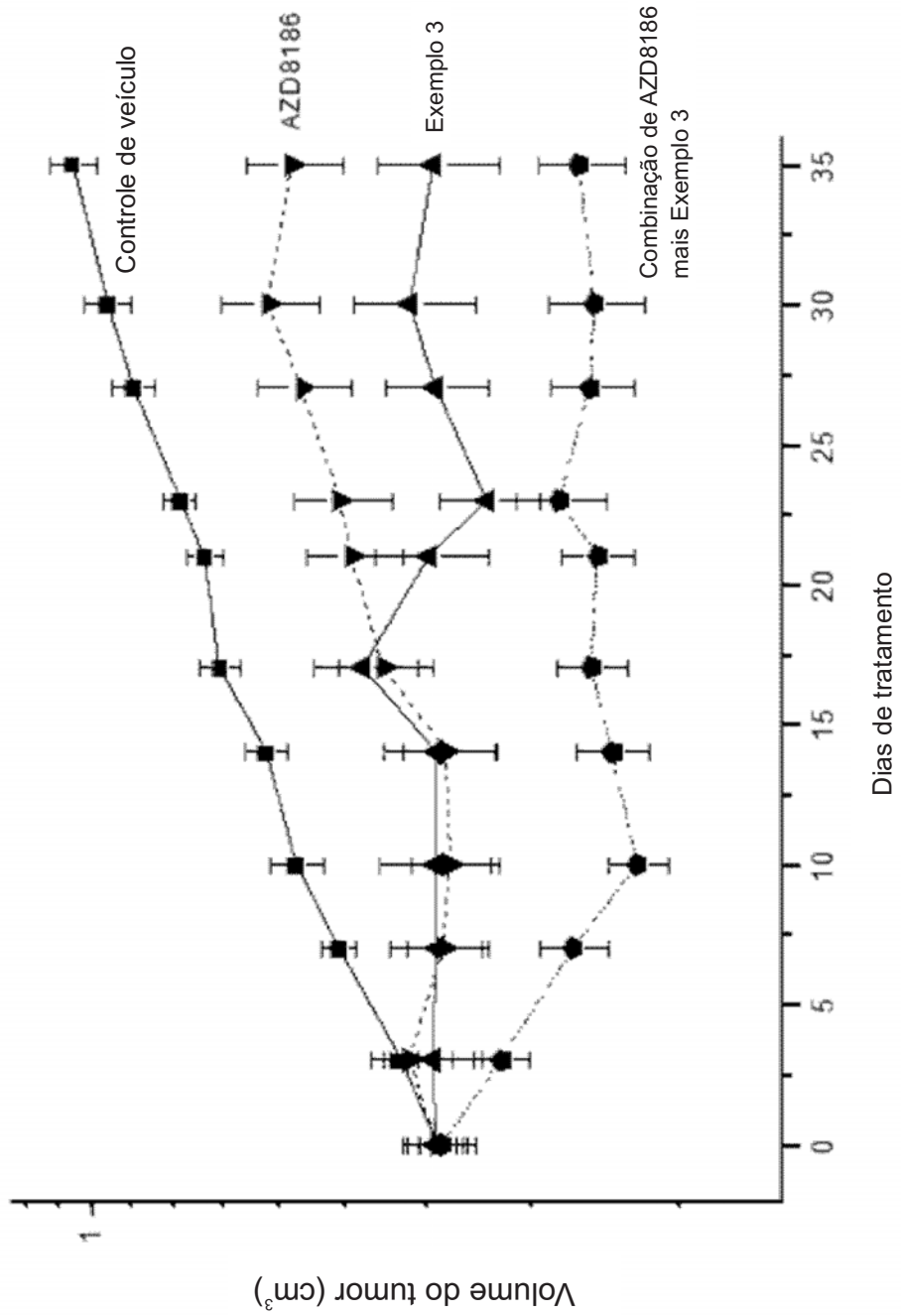


Figura 13: Inibição de crescimento de tumor pelo Exemplo 3 em combinação com AZD8186