

SIB EX3657R

V138213SM/BL

Traduzione del testo del Brevetto Europeo

domanda n° 11789754.6, pubblicazione n° 2578585

a nome di ONO Pharmaceutical Co., Ltd.

di 1-5, Doshomachi 2-chome

Chuo-ku

Osaka-shi, Osaka 541-8526

Giappone

“DERIVATO DEL PURINONE COME INIBITORE DELLA BTK CHINASI”

DESCRIZIONE

CAMPO TECNICO

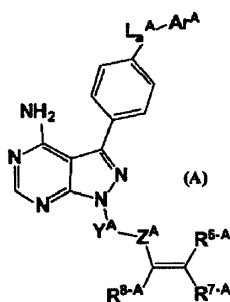
La presente invenzione riguarda 6-ammino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one e suoi sali (abbreviato in seguito come “composti della presente invenzione”).

FONDAMENTO DELLA TECNICA

La tirosina chinasi di Bruton (abbreviata in seguito come “Btk”) appartiene alla famiglia delle chinasi Tec, che sono tirosina chinasi non recettoriali, ed è espressa selettivamente nelle linee di cellule B e mielocitiche. Btk svolge un ruolo importante nella trasduzione del segnale nelle cellule B ed è un fattore che contribuisce alla sopravvivenza, alla differenziazione, alla proliferazione e all'attivazione delle cellule B. La segnalazione nelle cellule B attraverso il recettore per l'antigene delle cellule B (BCR) induce un'ampia gamma di risposte biologiche, e la trasduzione anomala del segnale qui causa l'attivazione anomala delle cellule B e la formazione di autoanticorpi patogeni. Si pensa che Btk formi un collegamento nelle vie di trasduzione del segnale mediate da BCR nelle cellule B. Pertanto, è noto che l'agammaglobulinemia collegata all'X (XLA) è causata da un difetto nel gene Btk umano che porta all'induzione di una differenziazione anomala delle cellule B e a un drastico declino della produzione di immunoglobuline (si veda il documento non brevettuale 1). I sintomi di questa malattia includono un sostanziale calo delle cellule B nel sangue periferico e una aumentata suscettibilità a infezioni batteriche. È noto anche che Btk partecipa all'attivazione dei mastociti e alle funzioni fisiologiche delle piastrine. A causa di ciò, i composti che hanno un'attività inibitoria su Btk sono efficaci nel trattamento di malattie cui partecipano cellule B o mastociti, per esempio, malattie allergiche, malattie autoimmuni, malattie infiammatorie, malattie tromboemboliche e cancro (di veda il documento non brevettuale 2).

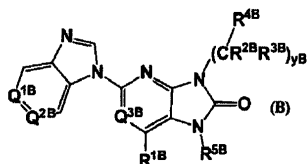
I seguenti composti sono noti come tecnica anteriore per i composti della presente invenzione.

I composti rappresentati dalla formula generale (A) sono noti come composti che hanno un'attività inibitoria su Btk.



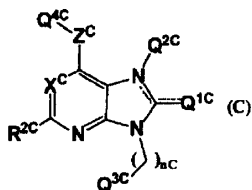
(nella formula L_a^A rappresenta CH_2 , O, NH, o S; Ar^A rappresenta arile sostituito o non sostituito, o eteroarile sostituito o non sostituito; Y^A rappresenta qualsiasi sostituente selezionato da alchile, eteroalchile, cicloalchile, eterocicloalchile, arile, ed eteroarile; Z^A rappresenta CO, OCO, NHCO, o CS; rappresentano ciascuno indipendentemente H, C_1 - C_4 alchile non sostituito, C_1 - C_4 alchile sostituito, C_1 - C_4 eteroalchile non sostituito, C_1 - C_4 eteroalchile sostituito, C_3 - C_6 cicloalchile non sostituito, C_3 - C_6 cicloalchile sostituito, C_2 - C_6 eterocicloalchile non sostituito, e C_2 - C_6 eterocicloalchile sostituito; o R^{7-A} e R^{8-A} insieme formano un legame; e R^{6-A} rappresenta H, C_1 - C_4 alchile sostituito o non sostituito, C_1 - C_4 eteroalchile sostituito o non sostituito, C_1 - C_6 alcossialchile, C_1 - C_8 alchilamminoalchile, C_3 - C_6 cicloalchile sostituito o non sostituito, o arile sostituito o non sostituito (le definizioni di questi gruppi sono state citate) (si vedano i documenti brevettuali 1, 2, e 3).

D'altra parte, per esempio, i composti rappresentati dalla formula generale (B)



(nella formula, Q^{1B} e Q^{2B} sono selezionati indipendentemente da CX^{1B} , CX^{2B} , e azoto; Q^{3B} rappresenta N o CH; X^{1B} e X^{2B} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da idrogeno, (C_1 - C_6) alchile, ciano, alogeno, e così via; R^{1B} è selezionato dal gruppo costituito da idrogeno e (C_1 - C_6) alchile; yB rappresenta 0 un numero intero da 1 a 3; R^{2B} e R^{3B} sono selezionati indipendentemente da idrogeno e (C_1 - C_6) alchile; R^{4B} è selezionato dal gruppo costituito da alchile, eterociclice, arile, eteroarile, e così via; e R^{5B} è selezionato dal gruppo costituito da alchile, eterociclice, ed eterociclice sostituito (le definizioni di questi gruppi sono state citate) (si veda il documento brevettuale 4) sono noti come composti che hanno uno scheletro purinonico.

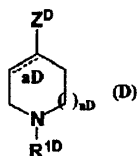
I composti rappresentati dalla formula generale (C) sono anch'essi noti.



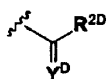
(nella formula, X^C è selezionato dal gruppo costituito da azoto e CR^{8C}; R^{8C} è selezionato dal gruppo costituito da idrogeno, alogeno, alchile sostituito o non sostituito, e così via; Q^{1C} è selezionato dal gruppo costituito da O, S, e così via; Z^C è selezionato dal gruppo costituito da ossigeno, zolfo e NY^{5C}; Y^{5C} è selezionato dal gruppo costituito da idrogeno, alchile sostituito o non sostituito, e così via; Q^{2C}, Q^{3C}, e Q^{4C} sono selezionati indipendentemente dal gruppo costituito da idrogeno, alchile sostituito o non sostituito, arile sostituito o non sostituito, e così via; R^{2C} è selezionato dal gruppo costituito da idrogeno e alchile sostituito o non sostituito; e n_C rappresenta 0, 1, 2, 3, o 4 (le definizioni di questi gruppi sono state citate) (si veda il documento brevettuale 5)

I composti aventi uno scheletro purinonico sono anch'essi descritti come formula 20 (si veda il numero di paragrafo 28) nel documento brevettuale 6.

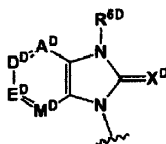
I composti rappresentati dalla formula generale (D) sono anch'essi noti.



(nella formula, R^{1D} rappresenta un gruppo selezionato da idrogeno, alchile sostituito o non sostituito,



e così via; R^{2D} rappresenta alogeno, alchile sostituito o non sostituito, alchenile sostituito o non sostituito o alchinile sostituito o non sostituito; Y^D rappresenta un gruppo selezionato da O, C-NO₂, e S; Z^D rappresenta un gruppo selezionato da



e così via; nella presente, A^D, D^D, E^D, e M^D rappresentano ciascuno indipendentemente CR^{12D}, N, e N-ossido; R^{12D} rappresenta un gruppo selezionato da idrogeno, alogeno, ammino, idrossi, e ciano; X^D rappresenta un gruppo selezionato da O, C-NO₂, e S; R^{6D} rappresenta un gruppo selezionato da cicloalchile sostituito o non sostituito, eteroalchile sostituito o non sostituito e arile sostituito o non sostituito; l'indicazione aD rappresentata dalla linea tratteggiata rappresenta un legame singolo o un doppio legame; e nD rappresenta un numero intero selezionato da 0, 1 e 2 (si veda il documento brevettuale 7).

I composti della presente invenzione sono composti che, oltre ad avere un'attività inibitoria selettiva su Btk, mostrano un'eccellente stabilità metabolica e possono prevenire un'attività inibitoria su CYP e reazioni avverse, come per esempio epatotossicità; tuttavia, non vi è alcuna dichiarazione o suggerimento riguardo a queste caratteristiche peculiari in alcuno dei documenti della tecnica antecedente.

Documento brevettuale 1: Traduzione giapponese della domanda PCT n. 2010-504324

Documento brevettuale 2: WO 2008/121742

Documento brevettuale 3: WO 2010/009342

Documento brevettuale 4: WO 2008/060301

Documento brevettuale 5: WO 2007/142755

Documento brevettuale 6: Traduzione giapponese della domanda PCT n. 2003-509427

Documento brevettuale 7: WO 2003/037890

Documento non brevettuale 1: Nature, Volume 361, pp. 226-233, 1993

Documento non brevettuale 2: Anticancer Agents in Medicinal Chemistry, Volume 7, numero 6, pp. 624-632, 2007

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Al fine di fornire un agente terapeutico molto sicuro per malattie cui partecipano cellule B e/o mastociti, uno scopo della presente invenzione è sviluppare un composto che, oltre ad avere un'attività inibitoria selettiva su Btk, mostri un'eccellente stabilità metabolica e possa prevenire l'epatotossicità.

Al fine di raggiungere lo scopo di cui sopra, i presenti inventori hanno realizzato studi approfonditi mirati a

scoprire composti aventi attività inibitoria selettiva su Btk e, come risultato, hanno individuato i composti della presente invenzione. Inoltre, è stato scoperto anche che questi composti sono composti che mostrano un'eccellente attività metabolica e possono prevenire l'epatotossicità, e come risultato è stata ottenuta la presente invenzione.

Vale a dire, la presente invenzione riguarda

[1] 6-ammino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one, o un suo sale; e e

[2] 6-ammino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one.

I composti della presente invenzione, oltre ad avere un'attività inibitoria selettiva su Btk, mostrano un'eccellente stabilità metabolica e possono impedire l'epatotossicità, e pertanto sono utili come agenti terapeutici molto sicuri per malattie cui partecipano cellule B e/o mastociti, come il linfoma non-Hodgkin.

MODALITÀ MIGLIORE PER REALIZZARE L'INVENZIONE

La presente invenzione viene descritta nel dettaglio in seguito.

Nella presente invenzione, "avente un'attività inibitoria selettiva su Btk" indica avere una un'attività inibitoria selettiva su Btk rispetto a tirosina chinasi non Btk e in particolare la proteina tirosina chinasi specifica dei linfociti (Lck), la proteina tirosina chinasi fyn (Fyn), e v-yes-1 isoforma A dell'omologo dell'oncogene correlato a virus sarcoma di Yamaguchi (LynA). Questa proprietà rende possibile la prevenzione di reazioni avverse imprevedibili causate dall'inibizione di altre tirosina chinasi. Per esempio, è nota la comparsa di anomalie della retina in topi privi di LcK (Oncogene, Volume 16, pp. 2351-2356, 1998), il che aumenta la possibilità che reazioni avverse siano causate a livello dell'occhio nel caso di una inibizione di Lck.

Nella presente invenzione, l'atomo di alogeno indica fluoro, cloro, bromo e iodio.

Nella presente invenzione, salvo specificamente indicato altrimenti, e come è evidente al tecnico del ramo, il simbolo



rappresenta il legame verso il lato posteriore del piano del foglio (cioè la posizione α); il

simbolo



rappresenta il legame verso il lato anteriore del piano del foglio (cioè la posizione β); e

il simbolo



rappresenta la posizione α , posizione β o la loro miscela in qualsiasi proporzione.

I composti della presente invenzione sono convertiti nei sali corrispondenti mediante metodi noti. Il sale è preferibilmente un sale idrosolubile. Sali adatti possono essere esemplificati dai sali con metalli alcalini (potassio e sodio), sali con metalli alcalino-terrosi (calcio e magnesio), sali di ammonio, sali con ammine organiche farmaceuticamente accettabili (tetrametilammonio, trietilammina, metilammina, dimetilammina, ciclopentilammina, benzilammina, fenetilammina, piperidina, monoetanolammina, dietanolammina, tris(idrossimetil)amminometano, lisina, arginina e N-metil-D-glucammina), e sali da addizione di acidi (sali di acidi inorganici (cloridrato, bromidrato, iodidrato, solfato, fosfato e nitrato) e sali di acidi organici (acetato, trifluoroacetato, lattato, tartrato, ossalato, fumarato, maleato, benzoato, citrato, metansolfonato, etansolfonato, benzensolfonato, toluensolfonato, isetionato, glucuronato e gluconato)).

I composti della presente invenzione e i loro sali possono essere anche convertiti in solvati. Il solvato è preferibilmente idrosolubile e ha bassa tossicità. Solvati adatti possono essere esemplificati da solvati con, per esempio, acqua o solvente alcolico (per esempio etanolo).

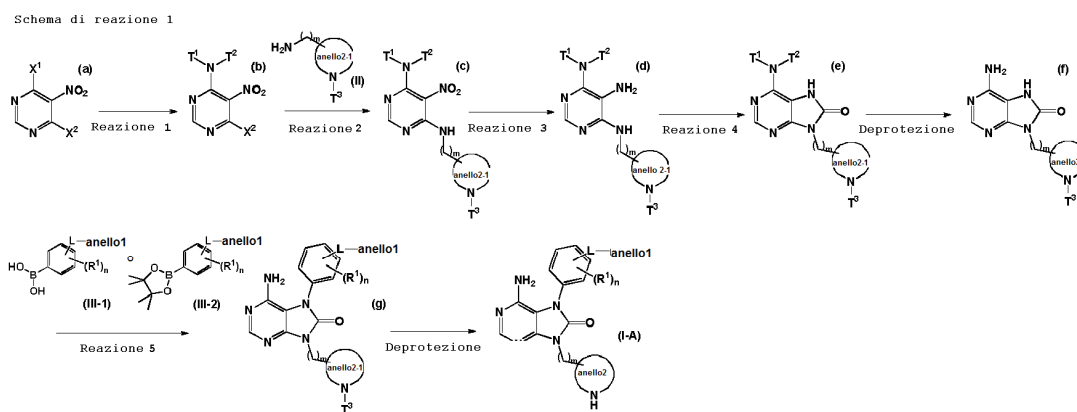
I composti della presente invenzione possono essere usati come profarmaci. Un profarmaco di un composto della presente invenzione indica un composto che è convertito mediante reazione *in vivo*, per esempio da parte di un enzima o di acido gastrico, nel composto della presente invenzione. I profarmaci dei composti della presente invenzione possono essere esemplificati da composti in cui - quando un composto della presente invenzione ha un gruppo idrossile - tale gruppo idrossile è acilato, alchilato, fosfatato, o borato (per esempio, composti forniti dall'acetilazione, palmitoilazione, propanoilazione, pivaloilazione, succinilazione, fumarilazione, alanilazione, o dimetilamminometilcarbonilazione del gruppo idrossile nei composti dell'invenzione); altri esempi sono

composti forniti dall'esterificazione o ammidazione di un gruppo carbossile in un composto della presente invenzione (per esempio, composti forniti dall'esterificazione etilica, esterificazione isopropilica, esterificazione fenilica, esterificazione carbossimetilica, esterificazione dimetilamminometilica, esterificazione pivaloilossimetilica, esterificazione etossicarbonilossietilica, esterificazione ftalidilica, esterificazione (5-metil-2-osso-1,3-diossolen-4-il)metilica, esterificazione cicloesilossicarboniletlica, o metilammidazione di un gruppo carbossile in un composto della presente invenzione). Questi composti possono essere preparati mediante metodi noti. Inoltre, il profarmaco di un composto della presente invenzione può essere un idrato o anidro. Il profarmaco di un composto della presente invenzione è convertito in condizioni fisiologiche nel composto della presente invenzione, come descritto alle pagine da 163 a 198 di Molecular Design nel volume 7 di Development of Medicines (Hirokawa Shoten Co., 1990). Inoltre, i composti della presente invenzione possono essere marcati con un isotopo (per esempio, ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I , e ^{125}I).

[Metodi per produrre i composti della presente invenzione]

I composti della presente invenzione possono essere prodotti modificando e combinando opportunamente metodi noti, per esempio i metodi descritti in Comprehensive Organic Transformations: A Guide to Functional Group Preparations, 2^a edizione (Richard C. Larock, John Wiley & Sons Inc., 1999), o i metodi forniti negli esempi.

I composti della presente invenzione possono essere prodotti usando il seguente schema di reazione 1.



(Nelle formule, T^1 e T^2 rappresentano ciascuno indipendentemente un gruppo protettivo per il gruppo amminico (per esempio, il gruppo benzile (Bn), il gruppo 4-metossibenzile, e il gruppo 3,4-dimetossibenzile); X^1 e X^2 rappresentano ciascuno indipendentemente un atomo di alogeno; l'anello2-1 rappresenta un anello 2^a che è stato protetto da un gruppo protettivo rappresentato da T^3 (per esempio, il gruppo tert-butossicarbonile (Boc) e il gruppo benzilossicarbonile (Cbz)); l'anello2a è un anello pirrolidinico, L è -O-, l'anello1 è un anello benzenico, m è 0 e n è 0.)

La reazione 1 nello schema di reazione 1 è nota e viene realizzata usando un composto con formula generale (a) e un derivato amminico protetto, cioè, un composto rappresentato da T^1T^2 -NH (T^1 e T^2 nella formula hanno le stesse definizioni precedenti) ed eseguendo la reazione in un solvente organico (per esempio, diclorometano, tetraidrofurano, diossano, dimetilformammide, dimetilacetammide, e 1-metil-2-pirrolidone) in presenza di una base (per esempio, trietilammina, N,N-diisopropilettilammina, piridina, 4-dimetilamminopiridina, e N-metilmorfolino) a una temperatura da -20 °C a temperatura ambiente.

La reazione 2 nello schema di reazione 1 è nota e viene realizzata usando un composto con formula generale (b) e un composto rappresentato dalla formula generale (II) ed eseguendo la reazione in un solvente organico (per esempio, diossano, acetonitrile, tetraidrofurano, dimetilformammide, dimetilacetammide, e 1-metil-2-pirrolidone) in presenza di una base (per esempio, trietilammina, N,N-diisopropilettilammina, piridina, 4-dimetilamminopiridina, e N-metilmorfolino) a una temperatura da -20 °C a 70 °C.

La reazione 3 nello schema di reazione 1 è nota e viene realizzata usando un composto rappresentato dalla formula generale (c) e usando a reagente metallico (per esempio, zinco, ferro, stagno, cloruro di stagno, cloruro di ferro, samario, indio, e sodio boroidruo-nickel cloruro) in un solvente miscibile in acqua (per esempio, etanolo, metanolo, tetraidrofurano, ed etil acetato) in presenza o assenza di un acido (per esempio, acido cloridrico, acido bromidrico, ammonio cloruro, acido acetico, e ammonio formiato) a una temperatura da 0 °C a 150 °C.

La reazione 4 nello schema di reazione 1 è nota e viene realizzata usando un composto rappresentato dalla formula generale (d) e usando un reagente (per esempio, 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI) e trifosgene) in un

solvente organico (per esempio, tetraidrofurano, dimetilformammide, e dimetilacetammide) in presenza o assenza di una base (per esempio, trietilammina, N,N-diisopropilettilammina, piridina, 4-dimetilamminopiridina, e N-metilmorfolino) a da una temperatura generata mediante raffreddamento in ghiaccio fino alla temperatura di reflusso.

Le reazioni di deprotezione per i gruppi protettivi nello schema di reazione 1 sono note e possono essere eseguite attraverso i metodi descritti di seguito. Esempi qui sono (1) reazioni di deprotezione basate su idrolisi alcalina, (2) reazioni di deprotezione in condizioni acide, (3) reazioni di deprotezione basate su idrogenolisi, (4) reazioni di deprotezione per il gruppo silile, (5) reazioni di deprotezione che usano un metallo, e (6) reazioni di deprotezione che usano un complesso metallico.

I metodi sono descritti specificamente di seguito.

(1) La reazione di deprotezione basata su idrolisi alcalina può essere realizzata, per esempio, in un solvente organico (per esempio, metanolo, tetraidrofurano, e diossano) a da 0 °C a 40 °C usando un idrossido di metallo alcalino (per esempio, idrossido di sodio, idrossido di potassio, e idrossido di litio), un idrossido di metallo alcalino-terroso (per esempio, idrossido di bario e idrossido di calcio), o un carbonato (per esempio, sodio carbonato e potassio carbonato), o una soluzione acquosa di quanto precede, o loro miscela.

(2) La reazione di deprotezione in reazioni acide può essere realizzata, per esempio, da 0 °C a 100 °C in presenza o assenza di 2,2,2-trifluoroetanolo, in un solvente organico (per esempio, diclorometano, cloroformio, diossano, etil acetato, metanolo, alcol isopropilico, tetraidrofurano, e anisolo) e in un acido organico (per esempio, acido acetico, acido trifluoroacetico, acido metansolfonico, e p-tosilato) o un acido inorganico (per esempio, acido cloridrico e acido solforico) o loro miscela (per esempio, idrogeno bromuro/acido acetico).

(3) La reazione di deprotezione basata su idrogenolisi può essere realizzata, per esempio, da 0 °C a 200 °C in un solvente (per esempio, un etere (per esempio, tetraidrofurano, diossano, dimetossietano, e dietil etere), un alcol (per esempio, metanolo ed etanolo), un solvente benzenico (per esempio, benzene e toluene), un chetone (per esempio, acetone e metil etil chetone), un nitrile (per esempio, acetoneitrile), un'ammide (per esempio, N,N-dimetilformammide), acqua, etil acetato, acido acetico, o un solvente misto di due o più dei precedenti) in

presenza di un catalizzatore (per esempio, palladio-carbonio, palladio nero, idrossido di palladio-carbonio, ossido di platino, e nickel Raney) in atmosfera di idrogeno a pressione normale o pressione elevata o in presenza di ammonio formiato.

(4) La reazione di deprotezione per il gruppo silile può essere realizzata, per esempio, da 0 °C a 40 °C in un solvente organico miscibile in acqua (per esempio, tetraidrofurano e acetonitrile) usando tetrabuttilammonio fluoruro. Può essere realizzata anche per esempio, da -10 °C a 100 °C in un acido organico (per esempio, acido acetico, acido trifluoroacetico, acido metansolfonico, e p-tosilato) o un acido inorganico (per esempio, acido cloridrico e acido solforico) o loro miscela (per esempio, idrogeno bromuro/acido acetico).

(5) La reazione di deprotezione che usa un metallo può essere realizzata, per esempio, da 0 °C a 40 °C in un solvente acido (per esempio, acido acetico, un tampone con un pH da 4,2 a 7,2 o una soluzione mista delle precedenti soluzioni con un solvente organico come tetraidrofurano) in presenza di polvere di zinco e ove necessario applicando ultrasuoni.

(6) La reazione di deprotezione che usa un complesso metallico può essere realizzata, per esempio, da 0 °C a 40 °C in un solvente organico (per esempio, diclorometano, N,N-dimetilformammide, tetraidrofurano, etil acetato, acetonitrile, diossano, ed etanolo), acqua, o loro soluzioni miste, usando un complesso metallico (per esempio, tetrakis(trifenilfosfin)palladio(0), bis(trifenilfosfin)palladio(II) dicloruro, palladio(II) acetato, e tris(trifenilfosfin)rodio(I) cloruro) in presenza di un reagente di intrappolamento (per esempio, idruro tributilstannico, trietilsilano, dimedone, morfolino, dietilammina, e pirrolidone), un acido organico (per esempio, acido acetico, acido formico, e acido 2-etilesanoico), e/o un sale di acidi organici (per esempio, sodio 2-etilesanoato e potassio 2-etilesanoato) e in presenza o assenza di un reagente di tipo fosfinico (per esempio, trifenilfosfina).

Oltre a quanto precede, la reazione di protezione può essere realizzata anche usando i metodi descritti, per esempio, in T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1999.

Il gruppo protettivo per un gruppo amminico può essere esemplificato dal gruppo benzilossicarbonile, gruppo t-butossicarbonile, gruppo allilossicarbonile (Alloc), gruppo 1-metil-1-(4-bifenil)etossicarbonile (Bpoc), gruppo

trifluoroacetile, gruppo 9-fluorenilmetossicarbonile, gruppo benzile (Bn), gruppo p-metossibenzile, gruppo benzilossimetile (BOM), e gruppo 2-(trimetilsilil)etossimetile (SEM).

Oltre a quanto precede, il gruppo protettivo per un gruppo amminico può essere qualsiasi gruppo capace di una eliminazione semplice e selettiva e non è altrimenti particolarmente limitato. Per esempio, possono essere usati i gruppi descritti in T. W. Greene, *Protective Groups in Organic Synthesis*, Wiley, New York, 1999.

La reazione 5 nello schema di reazione 1 è nota e viene realizzata usando un composto con formula generale (f) e un composto rappresentato dalla formula generale (III-1) o dalla formula generale (III-2) ed eseguendo la reazione da temperatura ambiente a 120 °C in un solvente organico (per esempio, diclorometano e acetonitrile) in presenza di una base (per esempio, piridina, trietilammina, e N,N-diisopropiletilammina), un sale di rame (per esempio, acetato di rame(II)), e un agente essiccante (per esempio, setaccio molecolare).

I composti della presente invenzione possono essere prodotti usando il composto rappresentato dalla formula generale (I-A) e un composto rappresentato dalla formula generale (I-D-1)



(R^{2d} nella formula è un gruppo C_3 alchililene) ed eseguendo una reazione da 0 °C a temperatura ambiente usando un agente condensante (per esempio, 1,3-dicicloesilcarbodiimmide (DCC), 1-etil-3-[3-(dimetilammino)propil]carbodiimmide (EDC), 1,1'-carbonildiimidazolo (CDI), 2-cloro-1-metilpiridinio ioduro, e anidride ciclica dell'acido 1-propanfosfonico (PPA)) in un solvente organico (per esempio, cloroformio, diclorometano, dimetilformammide, dimetilacetammide, dietil etere, e tetraidrofurano), o senza solvente, in presenza o assenza di una base (per esempio, trietilammina, piridina, N,N-diisopropiletilammina, 4-dimetilamminopiridina, e N-metilmorfolino) e con o senza l'uso di 1-idrossibenzotriazolo (HOBT).

I composti usati come materiali di partenza in ciascuna delle reazioni in questa Descrizione, per esempio, formula generale (a), (II), (III-1), (III-2) e (I-D-1), sono noti o possono essere facilmente prodotti mediante metodi noti.

Per ciascuna delle reazioni in questa Descrizione, le reazioni accompagnate dall'applicazione di calore possono essere realizzate usando un bagno in acqua, un bagno in olio, bagno in sabbia o microonde, come sarà evidente

al tecnico del ramo.

Un reagente in fase solida, comprendente il reagente trasportato su un polimero a elevato peso molecolare (per esempio polistirene, poliacrilammide, polipropilene, e polietilenglicole) può essere usato ove appropriato nelle reazioni in questa Descrizione.

Il prodotto di reazione in ciascuna delle reazioni di questa Descrizione può essere purificato attraverso le usuali modalità di purificazione, per esempio, usando metodi come distillazione a pressione normale o a pressione ridotta, cromatografia liquida ad elevate prestazioni usando gel di silice o silicato di magnesio, cromatografia su strato sottile, resine a scambio ionico, resine scavenger, cromatografia su colonna, lavaggio e ricristallizzazione. La purificazione può essere realizzata in ciascuna reazione o può essere eseguita dopo il completamento di diverse reazioni.

[Tossicità]

I composti della presente invenzione hanno una tossicità bassa in modo accettabile, per esempio, non hanno quasi attività inibitoria su CYP e quasi nessuna epatotossicità, e pertanto possono essere usati in sicurezza come principio attivo farmaceutico.

[Applicazione a sostanze farmaceutiche]

I composti della presente invenzione hanno un'attività inibitoria selettiva su Btk e pertanto sono utili come agenti per prevenire e/o trattare malattie correlate a Btk, cioè malattie cui partecipano cellule B e/o mastociti, per esempio, malattie allergiche, malattie autoimmuni, malattie infiammatorie, malattie tromboemboliche, cancro e malattie di trapianto contro ospite. I composti della presente invenzione esercitano anche un'azione inibitoria selettiva sull'attivazione delle cellule B e pertanto sono efficaci anche come inibitori dell'attivazione delle cellule B.

Le malattie allergiche nella presente invenzione possono essere esemplificate da allergie, anafilassi, congiuntivite allergica, rinite allergica e dermatite allergica.

Le malattie autoimmuni nella presente invenzione possono essere esemplificate da malattia infiammatoria dell'intestino, artrite, osteoartrite, malattia di Still, artrite giovanile, diabete di tipo I, miastenia gravis, tiroidite di

Hashimoto, tiroidite di Ord, malattia di Basedow, sindrome di Sjögren, sclerosi multipla, sindrome di Guillain-Barré, encefalomielite acuta disseminata, malattia di Addison, sindrome opsoclono-mioclono, spondilite anchilosante, sindrome degli anticorpi anti-fosfolipidi, anemia aplastica, epatite autoimmune, malattia celiaca, sindrome di Goodpasture, porpora trombocitopenica idiopatica, neurite ottica, scleroderma, cirrosi primaria biliare, malattia di Reiter, arterite di Takayasu, arterite temporale, anemia emolitica autoimmune calda, granuloma di Wegener, psoriasi, alopecia universalis, malattia di Behçet, sindrome di fatica cronica, disautonomia, endometriosi, cistite interstiziale, miotonia, vulvodinia, e lupus eritematoso sistemico.

Le malattie infiammatorie nella presente invenzione possono essere esemplificate da asma, appendicite, blefarite, bronchiolite, bronchite, borsite, cervicite, colangite, colecistite, colite, congiuntivite, cistite, dacrioadenite, dermatite, dermatomiosite, encefalite, endocardite, endometrite, enterite, epicondilite, epididimite, fascite, fibrosite, gastrite, gastroenterite, epatite, idroadenite suppurativa, laringite, mastite, meningite, mielite, miocardite, miosite, nefrite, ooforite, orchite, osteite, pancreatite, parotite, pericardite, peritonite, faringite, pleurite, flebite, polmonite, proctite, prostatite, pielonefrite, rinite, salpingite, sinusite, stomatite, sinovite, tendinite, tonsillite, uveite, vaginite, vasculite, e vulvite.

Le malattie tromboemboliche nella presente invenzione possono essere esemplificate da infarto del miocardio, angina pectoris, riuclusione dopo angioplastica, restenosi dopo angioplastica, riuclusione dopo bypass coronarico, restenosi dopo bypass aortocoronarico, ictus, ischemia transiente, disturbi occlusivi arteriosi periferici, embolia polmonare e trombosi venosa profonda.

Nella presente invenzione, i cancro includono linfomi non-Hodgkin, tra i quali sono particolarmente adatti i linfomi non-Hodgkin a cellule B, per esempio, linfoma di Burkitt, linfoma correlato ad AIDS, linfoma a cellule B della zona marginale (linfoma a cellule B della zona marginale nodale linfoma a cellule B della zona marginale extranodale, e linfoma a cellule B della zona marginale splenico), linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma a effusione primaria, granulomatosi linfomatoide, linfoma follicolare, leucemia linfocitica cronica a cellule B, leucemia prolinfocitica a cellule B, leucemia linfoplasmacitica/macroglobulinemia di Waldenström, plasmacitoma, linfoma mantellare, linfoma a grandi cellule B mediastinale, linfoma a grandi cellule B

intravascolare, e leucemia a cellule capellute. Oltre al linfoma non Hodgkin, i cancri nella presente invenzione includono tumori endocrini pancreatici, per esempio insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, somatostatinoma, VIPoma, PPoma, e GRFoma.

Un composto della presente invenzione può essere somministrato da solo o può essere somministrato come preparazione combinata con un altro farmaco allo scopo di

- 1) integrare e/o potenziare l'effetto profilattico e/o terapeutico del composto;
- 2) migliorare la farmacocinetica e l'assorbimento e ridurre la dose del composto, e/o
- 3) ridurre le reazioni avverse del composto.

La preparazione combinata di un composto della presente invenzione con un altro farmaco può essere somministrata sotto forma di un agente miscelato in cui entrambi i componenti sono miscelati in una singola formulazione o può essere somministrata come formulazioni separate. La somministrazione come formulazioni separate include la somministrazione simultanea e la somministrazione in tempi diversi. Nel caso di somministrazione in tempi diversi, il composto della presente invenzione può essere somministrato per primo, seguito dalla somministrazione dell'altro farmaco, o l'altro farmaco può essere somministrato per primo, seguito dalla somministrazione del composto della presente invenzione. Può essere usato lo stesso metodo di somministrazione per ciascuno, o possono essere usati metodi di somministrazione diversi.

Non esiste alcuna particolare limitazione circa le malattie che possono essere sottoposte a prevenzione e/o trattamento mediante la preparazione combinata summenzionata, e questa preparazione combinata può essere usata con qualsiasi malattia con cui l'effetto di prevenzione e/o trattamento del composto della presente invenzione è integrato e/o potenziato.

Questo altro farmaco per integrare e/o potenziare l'effetto profilattico e/o terapeutico dei composti della presente invenzione nei confronti di malattie allergiche può essere esemplificato da antistaminici, antagonisti di leucotrieni, farmaci antiallergici, antagonisti del recettore A2 del trombossano, inibitori della sintesi di trombossano e steroidi.

L'altro farmaco per integrare e/o potenziare l'effetto profilattico e/o terapeutico dei composti della presente

invenzione nei confronti di malattie autoimmuni può essere esemplificato da immunosoppressori; steroidi; farmaci antireumatici modificatori della malattia; inibitori di elastasi; agonisti del recettore 2 dei cannabinoidi; prostaglandine; inibitori della prostaglandina sintasi; inibitori della fosfodiesterasi; inibitori di metalloproteasi; inibitori di molecole di adesione; agenti proteici anti-citochine come agenti anti-TNF- α , agenti anti-IL-1, e agenti anti-IL-6; inibitori di citochina; antinfiammatori non steroidei; e anticorpi anti-CD20.

L'altro farmaco per integrare e/o potenziare l'effetto profilattico e/o terapeutico dei composti della presente invenzione nei confronti di malattie infiammatorie può essere esemplificato da steroidi, inibitori di elastasi, agonisti del recettore 2 dei cannabinoidi, prostaglandine, inibitori di prostaglandina sintasi, inibitori di fosfodiesterasi, inibitori di metalloproteasi, inibitori di molecole di adesione, anti-leucotrieni, agenti anti-colinergici, antagonisti del recettore A2 di trombociti, inibitori della trombociti sintasi, derivati da xantina, espettoranti, antibatterici, antistaminici, agenti forscolinici, inibitori di mediatori del rilascio, e antinfiammatori non steroidei.

L'altro farmaco per integrare e/o potenziare l'effetto profilattico e/o terapeutico dei composti della presente invenzione nei confronti di malattie tromboemboliche può essere esemplificato da agenti trombolitici, eparina, eparinoidi, eparine a basso peso molecolare, warfarina, inibitori della trombina, inibitori del fattore Xa, antagonisti del recettore ADP e inibitori di cicloossigenasi.

L'altro farmaco per integrare e/o potenziare l'effetto profilattico e/o terapeutico dei composti della presente invenzione nei confronti di linfomi non Hodgkin può essere esemplificato da agenti alchilanti, antimetaboliti, antibiotici antitumorali, alcaloidi vegetali, ormoni, composti del platino, anticorpi anti-CD20, e altri agenti anticancro.

Gli antistaminici possono essere esemplificati da azelastina cloridrato, ebastina, epinastina cloridrato, emedastina fumarato, auranofin, oxatomide, olopatadina cloridrato, dl-clorfeniramina maleato, clemastina fumarato, chetotifen fumarato, cimetidina, dimenidrinato, difenidrammina cloridrato, ciproheptadina cloridrato, cetirizina cloridrato, desloratadina, terfenadina, famotidina, fexofenadina cloridrato, bepotastina, bepotastina besilato, mizolastina, mequitazina, mometasone furoato, ranitidina, ranitidina cloridrato, loratadina, prometazina

cloridrato, e omoclorciclizina cloridrato.

Gli antagonisti dei leucotrieni possono essere esemplificati da pranlukast idrato, montelukast sodio, zafirlukast, ablukast, pobilukast, sulukast, iralukast sodio, verlukast, ritolukast, cinalukast, pirodomast, tomelukast, e doqualast.

I farmaci antiallergici possono essere esemplificati da amlexanox, azelastina cloridrato, israpafant, ibudilast, imitrodast sodio, ebastina, epinastina cloridrato, emedastina fumarato, ossatomide, ozagrel cloridrato, olopatadina cloridrato, acido cromoglicico, sodio cromoglicato, ketotifen fumarato, seratrodist, cetirizina cloridrato, suplastat tosilato, tazanolast, terfenadina, domitroban calcio idrato, tranilast, nedocromil, fexofenadina, fexofenadina cloridrato, pemirolast potassio, mequitazina, ramatroban, repirinast, e loratadina.

Gli antagonisti del recettore A2 dei trombociti possono essere esemplificati da seratrodist, domitroban calcio idrato, e ramatroban.

Gli inibitori della trombocita sintasi possono essere esemplificati da imitrodast sodio e ozagrel cloridrato.

Gli steroidi possono essere esemplificati da amcinonide, idrocortisone sodio succinato, prednisolone sodio succinato, metilprednisolone sodio succinato, ciclesonide, difluprednato, betametasona propionato, dexametasone, deflazacort, triamcinolone, triamcinolone acetone, alcinonide, dexametasone palmitato, idrocortisone, flumetasone pivalato, prednisolone butilacetato, budesonide, prasterone solfato, mometasone fideato, fluocinonide, fluocinolone acetone, fludrossicortide, flunisolide, prednisolone, alclometasone propionato, clobetasol propionato, dexametasone propionato, deprodone propionato, fluticasone propionato, beclometasone propionato, betametasona, metilprednisolone, metilprednisolone suleptanato, metilprednisolone sodio succinato, dexametasone sodio fosfato, idrocortisone sodio fosfato, prednisolone sodio fosfato, diflucortolone valerato, dexametasone valerato, betametasona valerato, prednisolone valerato acetato, cortisone acetato, diflorasone acetato, dexametasone acetato, triamcinolone acetato, parametasone acetato, alopredone acetato, fludrocortisone acetato, prednisolone acetato, metilprednisolone acetato, clobetasone butirrato, idrocortisone butirrato, idrocortisone butirrato propionato, e betametasona butirrato propionato.

Gli immunosoppressori possono essere selezionati da azatioprina, ascomicina, everolimus, salazosolfapiridina,

ciclosporina, ciclofosfamide, sirolimus, tacrolimus, bucillamina, metotrexato, e leflunomide.

I farmaci antireumatici modificatori della malattia possono essere esemplificati da D-penicillamina, actarit, auranofin, salazosolfapiridina, idrossiclorochina, bucillamina, metotrexato, leflunomide, lobenzarit sodio, aurotioglucosio, e sodio aurotiomalato.

Gli inibitori dell'elastasi possono essere esemplificati da ONO-5046, ONO-6818, MR-889, PBI-1101, EPI-HNE-4, R-665, ZD-0892, ZD-8321, GW-311616, DMP-777, L-659286, L-680833, L-683845, e AE-3763.

Le prostaglandine (abbreviate come "PG") possono essere esemplificate da farmaci PGE1 (esempi: alprostadiil alfadex, alprostadiil), farmaci PGI2 (esempio: beraprost sodio), agonisti del recettore delle PG, e antagonisti del recettore delle PG. Il recettore delle PG può essere esemplificato da recettori di PGE (EP1, EP2, EP3, e EP4), recettori di PGD (DP, CRTH2), recettori di PGF (FP), recettori di PGI2 (IP), e recettori di TX (TP).

Gli inibitori della prostaglandina sintasi possono essere esemplificati da salazosolfapiridina, mesalazina, olsalazina, acido 4-amminosalicilico, JTE-522, auranofin, carprofene, difenpiramide, flunossaprofene, flurbiprofene, indometacina, chetoprofene, lornoxicam, lossoprofene, meloxicam, ossaprozina, parsamide, piroxifen, piroxicam, piroxicam cinnamato, zaltoprofene, e pranoprofene.

Gli inibitori della fosfodiesterasi possono essere esemplificati da rolipram, cilomilast, Bayl9-8004, NIK-616, roflumilast (BY-217), cipamfillina (BRL-61063), atizoram (CP-80633), ONO-6126, SCH-351591, YM-976, V-11294A, PD-168787, D-4396, e IC-485.

Gli inibitori delle molecole di adesione possono essere esemplificati da antagonisti dell'integrina $\alpha 4$.

Gli agenti anti-TNF- α possono essere esemplificati da anticorpi anti-TNF- α , recettore solubile di TNF- α , anticorpi anti recettore di TNF- α , e proteina che lega TNF- α solubile e in particolare da infliximab ed etanercept.

Gli agenti anti-IL-1 possono essere esemplificati da anticorpi anti-IL-1, recettore di IL-1 solubile, anticorpi anti anti-IL-1Ra e/o anticorpi anti recettore di IL-1 e in particolare da anakinra.

Gli agenti anti-IL-6 possono essere esemplificati da anticorpi anti-IL-6, recettore di IL-6 solubile e anticorpi anti recettore di IL-6 e in particolare da tocilizumab.

Gli inibitori delle citochine possono essere esemplificati da suplatast tosilato, T-614, SR-31747, e sonatimod.

Gli agenti anticolinergici possono essere esemplificati da triesifenidile, triesifenidile cloridrato, biperidene, e biperidene cloridrato.

I derivati delle xantine possono essere esemplificati da amminofillina, teofillina, dossofillina, sipamfillina, e diprofillina.

Gli espettoranti possono essere esemplificati da spirito di ammonio fenicolato, sodio bicarbonato, bromesina cloridrato, carbocisteina, ambrossol cloridrato, metilcisteina cloridrato, acetilcisteina, etil L-cisteina cloridrato, e tilossapol.

Gli antibatterici possono essere esemplificati da sodio cefurossima, meropenem triidrato, netilmicina solfato, sisomicina solfato, ceftibutene, PA-1806, IB-367, tobramicina, PA-1420, dossorubicina, astromicina solfato, e cefetamet pivoxil cloridrato.

Gli inibitori del rilascio di mediatori possono essere esemplificati da tranilast, sodio cromoglicato, amlexanox, repirinast, ibudilast, dazanolast, e pemirolast potassio.

Gli agenti trombolitici possono essere esemplificati da alteplasi, urochinasi, tisochinasi, nasaruplasi, nateplasi, t-PA, pamiteplasi, monteplasi, prourochinasi, e streptochinasi.

Gli eparinoidi possono essere esemplificati da fondaparinux.

Le eparine a basso peso molecolare possono essere esemplificate da danaparoid sodio, enoxaparina (sodio), nadroparina calcio, bemiparina (sodio), reviparina (sodio), e tinzaparina (sodio).

L'inibitore della trombina può essere esemplificato da argatroban, ximelagatran, melagatran, dabigatran, bivalirudina, lepirudina, irudina, e desirudina.

Gli antagonisti del recettore di ADP possono essere esemplificati da ticlopidina cloridrato e clopidogrel solfato.

Gli inibitori di cicloossigenasi possono essere esemplificati da aspirina.

Gli agenti alchilanti possono essere esemplificati da mostarda N-ossido cloridrato, ciclofosfammide, ifosfammide, melffalan, tiotepa, carboquone, busolfan, nimustina cloridrato, dacarbazina, e ranimustina.

Gli antimetaboliti possono essere esemplificati da metotrexato, mercaptopurina, 6-mercaptopurina ribosuro, fluorouracile, tegafur, tegafur uracile, carmofur, doxifluridina, citarabina, enocitabina, tegafur gimestat otastat

potassio, gemcitabina cloridrato, citarabina ottosfato, procarbazina cloridrato, e idrossicarbammide.

Gli antibiotici anticancro possono essere esemplificati da actinomicina D, mitomicina C, daunorubicina cloridrato, doxorubicina cloridrato, aclarubicina cloridrato, neocarzinostatina, pirarubicina cloridrato, epirubicin (cloridrato), idarubicina cloridrato, cromomicina A3, bleomicina (cloridrato), peplomicina solfato, terarubicina, e zinostatina stimalamero.

Gli alcaloidi venegati possono essere esemplificati da vinblastina solfato, vincristina solfato, vindesina solfato, irinotecan cloridrato, etoposide, flutamide, vinorelbina tartrato, docetaxel idrato, e paclitaxel.

Gli ormoni possono essere esemplificati da estramustina fosfato sodio, mepitiostano, epitiostanolo, goserelina acetato, fosfestrolo (dietilstilbestrolo fosfato), tamoxifene citrato, toremifene citrato, fadrozolo cloridrato idrato, medrossiprogesterone acetato, bicalutamide, leuprorelina acetato, anastrozolo, ed exemestano.

I composti del platino possono essere esemplificati da carboplatino, cisplatino, e nedaplatino.

Gli anticorpi anti-CD20 possono essere esemplificati da rituximab, ibritumomab, e ocrelizumab.

Gli altri agenti anticancro possono essere esemplificati da L-asparaginasi, octreotide acetato, porfimerone sodio, e mitoxantrone acetato.

La preparazione combinata comprendente una combinazione con un composto della presente invenzione non solo include le preparazioni combinate scoperte finora, ma include anche le preparazioni combinate che possono essere scoperte in futuro.

I composti della presente invenzione sono somministrati in generale per via sistemica o locale come componente farmaceuticamente efficace in forma orale o parenterale. Le formulazioni orali possono essere esemplificate da liquidi per somministrazione orale (per esempio elisir, sciroppi, formulazioni farmaceuticamente accettabili a base d'acqua, sospensioni ed emulsioni), e solidi per somministrazione orale (per esempio compresse (incluse compresse sublinguali e compresse che si disintegrano oralmente), pillole, capsule (incluse capsule dure, capsule molli, capsule di gelatina e microcapsule), polveri, granuli e pastiglie). Le formulazioni parenterali possono essere esemplificate da soluzioni (per esempio iniettabili (per esempio iniettabili sottocutanei, iniettabili intravenosi, iniettabili intramuscolari, iniettabili intraperitoneali e formulazioni da gocciolamento), gocce oculari

(per esempio gocce oculari acquose (per esempio gocce oculari acquose, sospensioni oculari acquose, gocce oculari viscoso e gocce oculari solubilizzate) e gocce oculari non acquose (per esempio gocce oculari non acquose e sospensioni oculari non acquose)), sostanze topiche (per esempio unguenti (per esempio unguenti oftalmici)) e gocce auricolari), Queste formulazioni possono essere formulazioni a rilascio controllato, come formulazioni a rilascio rapido e formulazioni a rilascio prolungato. Queste formulazioni possono essere prodotte mediante metodi noti, per esempio mediante i metodi descritti nella farmacopea giapponese.

I liquidi per la somministrazione orale all'interno del contesto delle formulazioni orali possono essere prodotti, per esempio, sciogliendo, sospendendo o emulsionando il componente efficace in un diluente usato comunemente (per esempio acqua purificata, etanolo o una loro miscela). Queste formulazioni liquide possono contenere anche per esempio un agente umettante, agente sospensivo, agente emulsionante, dolcificante, aromatizzante, fragranza, conservante e tampone.

I solidi per la somministrazione orale all'interno del contesto delle formulazioni orali possono essere preparati per esempio miscelando il componente efficace con, per esempio, un veicolo (per esempio lattosio, mannitolo, glucosio, cellulosa microcristallina e amido), un legante (per esempio idrossipropilcellulosa, polivinilpirrolidone e magnesio metasilicato alluminato), un disintegrante (per esempio cellulosa calcio glicolato), un lubrificante (per esempio stearato di magnesio), uno stabilizzante, un adiuvante della dissoluzione (per esempio acido glutammico e acido aspartico) e formulando secondo metodi standard. Secondo necessità, si può realizzare un rivestimento con un agente di rivestimento (per esempio zucchero, gelatina, idrossipropilcellulosa, e idrossipropil metil cellulosa ftalato) e possono essere applicati due o più strati.

All'interno del contesto delle formulazioni parenterali, si può produrre una sostanza topica usando un metodo noto o una formulazione di uso comune. Per esempio, si può preparare un unguento incorporando o sciogliendo il componente efficace in una base. La base dell'unguento è selezionata da basi per unguenti note o da una base per unguenti di uso comune. Per esempio, può essere usata una singola selezione dei seguenti o una miscela di due o più selezioni dei seguenti: acidi grassi superiori ed esteri di acidi grassi superiori (per esempio acido adipico, acido miristico, acido palmitico, acido stearico, acido oleico, esteri di adipato, esteri di miristato, esteri

di palmitato, esteri di stearato ed esteri di oleato), cere (per esempio cera d'api, spermaceti e ceresina), surfattanti (per esempio esteri di fosfato di poliossietilene alchil etere), alcoli superiori (per esempio, cetanolo, alcol stearilico, e alcol cetostearilico), oli di silicone (per esempio, dimetilpolisilossano), idrocarburi (per esempio, petrolato idrofilo, petrolato bianco, lanolina purificata, e paraffina liquida), glicoli (per esempio, etilen glicole, dietilen glicole, propilen glicole, polietilen glicole, e macrogol), oli vegetali (per esempio, olio di ricino, olio di oliva, olio di sesamo, e olio di trementina), oli animali (per esempio, olio di visone, olio di tuorlo d'uovo, squalano, e squalene), acqua, promotori dell'assorbimento, e anti-irritanti. Possono essere incorporati anche un umettante, conservante, stabilizzante, antiossidante e fragranza.

Iniettabili all'interno del contesto di formulazioni parenterali comprendono soluzioni, sospensioni ed emulsioni così come iniettabili solidi usati tramite dissoluzione o sospensione in un solvente al momento dell'uso. Per esempio, si può usare un iniettabile in cui il componente efficace è disciolto, sospeso o emulsionato in un solvente. Per esempio, possono essere usati acqua distillata per iniezione, soluzione salina fisiologica, un olio vegetale, propilen glicole, polietilen glicole, un alcol come etanolo, o una combinazione dei precedenti. L'iniettabile può contenere anche uno stabilizzante, un adiuvante di dissoluzione (per esempio acido glutammico, acido aspartico e Polisorbato 80 (marchio registrato)), un agente sospensivo, un agente emulsionante, un agente lenitivo, un tampone e un conservante. L'iniettabile può essere sterilizzato nella fase finale o può essere prodotto usando processi asettici. L'iniettabile può essere prodotto anche come forma solida sterile, per esempio, prodotto liofilizzato e può essere usato dopo dissoluzione in acqua distillata per iniezione o in un altro solvente, che è sterile o è sterilizzato prima dell'uso.

La dose, quando è usato un composto della presente invenzione come componente efficace in un farmaco, può essere selezionata come opportuno a seconda di, per esempio, i sintomi, l'età e il tipo di formulazione. Nel caso di una formulazione orale, possono essere somministrati preferibilmente da 1 mg a 100 mg e più preferibilmente da 5 mg a 30 mg da una a diverse volte al giorno (per esempio da una a tre volte). Nel caso di gocce oculari, possono essere instillate da una a diverse gocce per somministrazione di una soluzione oftalmica avente una concentrazione preferibilmente da 0,000001% a 5% (p/v) e più preferibilmente da 0,00001% a 0,05% (p/v) da

una a diverse volte al giorno (per esempio da una a otto volte). Nel caso di un unguento oftalmico, un unguento oftalmico può essere applicato a una concentrazione preferibilmente da 0,000001% a 5% (p/v) e più preferibilmente da 0,00001% a 0,05% (p/v) da una a diverse volte al giorno (per esempio da una a quattro volte). Naturalmente, come indicato sopra, la dose dipenderà da varie condizioni e pertanto si presenteranno casi in cui una quantità inferiore rispetto ai dosaggi sopra citati sarà sufficiente o in cui questi intervalli dovranno essere superati.

ESEMPI

La presente invenzione è descritta di seguito usando esempi, ma la presente invenzione non è limitata da tali esempi.

I solventi indicati tra parentesi per TLC e nelle sezioni sulla separazione cromatografica indicano i solventi di eluizione o i solventi di sviluppo usati, e le proporzioni sono rapporti in volume.

Salvo specificamente indicato altrimenti, i dati di NMR sono dati per ¹H-NMR.

Il solvente usato nella misurazione viene fornito tra parentesi nella sezione NMR.

I nomi dei composti usati in questa descrizione sono generalmente nomi generati in base a regole di nomenclatura IUPAC o generati usando ACD/Name (marchio registrato), un programma per computer di Advanced Chemistry Development, Inc., che fornisce la nomenclatura in base alle regole IUPAC.

Esempio 1 (riferimento)

N,N-dibenzil-6-cloro-5-nitropirimidin-4-ammina dibenzilammina (10,2 g) in una soluzione di diclorometano (30 mL) è stata aggiunta goccia a goccia su un bagno in ghiaccio a una soluzione in diclorometano (70 mL) di 4,6-dicloro-5-nitropirimidina (10 g). A ciò è seguita l'aggiunta di trietilammina (14,4 mL) e agitazione per 1 ora. Acqua è stata quindi aggiunta alla miscela di reazione e lo strato organico è stato successivamente lavato con soluzione acquosa satura di cloruro di sodio ed essiccato su solfato di sodio anidro. Il solvente è stato concentrato a pressione ridotta per ottenere il composto del titolo (19,2 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto. TLC: R_f 0,50 (esano : etil acetato = 7: 1).

Esempio 2 (riferimento)

tert-butil 3-[[6-(dibenzilammino)-5-nitropirimidin-4-il]ammino}azetidin-1-carbossilato

Il composto (10,3 g) preparato nell'Esempio 1 e tert-butil 3-amminoazetidin-1-carbossilato (5,0 g) sono stati disciolti in diossano (58 mL); È stata aggiunta trietilammina (8,1 mL). ed è stata eseguita agitazione per 5 ore a 50 °C. La miscela di reazione è stata riportata a temperatura ambiente; il solvente è stato quindi eliminato per distillazione; è stata aggiunta acqua; e l'estrazione è stata effettuata con etil acetato. Lo strato organico è stato lavato con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio e successivamente essiccato su solfato di sodio anidro e il solvente è stato rimosso mediante distillazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice per ottenere il composto del titolo (10,8 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto. TLC: Rf 0,40 (esano : etil acetato = 4 : 1).

Esempio 3 (riferimento)

tert-butil 3-[[5-ammino-6-(dibenzilammino)pirimidin-4-il]ammino}azetidin-1-carbossilato

Una soluzione in etil acetato (360 mL) soluzione del composto (17,5 g) preparato nell'Esempio 2 è stata aggiunta goccia a goccia a una miscela di zinco (23,3 g) e a una soluzione acquosa di cloruro di ammonio 3,0 M (11,4 g) su un bagno in ghiaccio e la temperatura è stata immediatamente aumentata a temperatura ambiente. In seguito ad agitazione per 2 ore, la miscela di reazione è stata filtrata su Celite (nome commerciale) e il solvente è stato quindi eliminato per distillazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice per ottenere il composto del titolo (12,4 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto.

TLC: Rf 0,69 (esano : etil acetato = 1 : 1).

Esempio 4 (riferimento)

tert-butil 3-[6-(dibenzilammino)-8-ossolo-7,8-diidro-9H-purin-9-il]azetidin-1-carbossilato

Il composto (8,4 g) preparato nell'Esempio 3 e 1,1'-carbonildiimidazolo (5,9 g) sono stati disciolti in tetraidrofurano (120 mL) cui è seguita agitazione per 15 ore a 60 °C. Dopo che il solvente è stato distillato dalla miscela di reazione, è stata aggiunta acqua ed è stata eseguita l'estrazione con etil acetato. Lo strato organico è stato lavato con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio ed essiccato su solfato di sodio anidro, e il solvente è stato rimosso mediante distillazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di

gel di silice per ottenere il composto del titolo (7,8 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto.

TLC: Rf 0,28 (esano : etil acetato = 2: 1).

Esempio 5 (riferimento)

tert-butil 3-(6-ammino-8-osso-7,8-diidro-9H-purin-9-il)azetidina-1-carbossilato

Il composto (7,8 g) preparato nell'Esempio 4 è stato disciolto in metanolo (240 mL) ed etil acetato (50 mL); è stato aggiunto catalizzatore di Pearlman al 20% ($\text{Pd}(\text{OH})_2/\text{C}$) (8,0 g, 100 % in peso); è stata realizzata la sostituzione con idrogeno; e il tutto è stato posto in agitazione per 7,5 ore a 60 °C. La miscela di reazione è stata filtrata su Celite (nome registrato) e il solvente è stato eliminato per distillazione per ottenere il composto del titolo (5,0 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto.

TLC: Rf = 0,50 (etil acetato)

Esempio 6 (riferimento)

tert-butil 3-[6-ammino-8-osso-7-(4-fenossifenil)-7,8-diidro-9H-purin-9-il]azetidina-1-carbossilato

Acido p-fenossifenilborico (2,1 g), acetato di rame(II) (1,48 g), setaccio molecolare 4A (2,5 g), e piridina (0,82 mL) sono stati aggiunti a temperatura ambiente a una sospensione in diclorometano (200 mL) del composto (2,5 g) preparato nell'Esempio 5, cui è seguita agitazione per 21 ore. La soluzione di reazione è stata filtrata su Celite (nome commerciale) e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di gel di silice per ottenere il composto del titolo (1,3 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto. TLC: Rf 0,18 (esano : etil acetato = 1 : 1).

Esempio 7 (riferimento)

6-ammino-9-azetidina-3-il-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one dicloridrato

Acido cloridrico/diossano 4N (13 mL) è stato aggiunto a temperatura ambiente a una sospensione in metanolo (13 mL) del composto (1,3 g, 2,76 mmol, 1,0 equivalente) preparato nell'Esempio 6 e il tutto è stato posto in agitazione per 1 ora. Il solvente è stato quindi eliminato per distillazione per ottenere il composto del titolo (1,5 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto.

TLC: Rf 0.50 (diclorometano : metanolo: ammoniacca acquosa al 28% = 9 : 1: 0,1).

Esempio 9 (riferimento)

tert-butil (3R)-3-{{6-(dibenzilammino)-5-nitropirimidin-4-il}ammino}piperidin-1-carbossilato

Il composto del titolo (1,44 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto è stato ottenuto seguendo lo stesso modello di processo dell'Esempio 2 usando il composto (1,5 g) prodotto nell'Esempio 1 e usando tert-butil (3R)-3-amminopiperidin-1-carbossilato (0,85 g) al posto di tert-butil 3-amminoazetidid-1-carbossilato.

TLC: Rf 0,23 (esano : etil acetato = 9 : 1).

Esempio 10 (riferimento)

6-ammino-7-(4-fenossifenil)-9-[(3R)-piperidin-3-il]-7,9-diidro-8H-purin-8-one dicloridrato

Il composto del titolo (1,55 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto è stato ottenuto seguendo lo stesso modello di processo dell'Esempio 3 → Esempio 4 → Esempio 5 → Esempio 6 → Esempio 7, usando il composto prodotto nell'Esempio 9 e usando acido p-fenossifenilborico (154 mg).

TLC: Rf 0,68 (metanolo: diclorometano : ammoniacca acquosa = 80 : 20: 4).

Esempio 17 (riferimento)

tert-butil 4-({6-(dibenzilammino)-5-nitropirimidin-4-il}ammino)metilpiperidin-1-carbossilato

Il composto del titolo (68,3 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto è stato ottenuto seguendo lo stesso modello di processo dell'Esempio 2 usando il composto (45,5 g) prodotto nell'Esempio 1 e usando tert-butil 4-(amminometil)piperidin-1-carbossilato (27,5 g) al posto di tert-butil 3-amminoazetidid-1-carbossilato.

TLC: Rf 0,56 (esano : etil acetato = 2 : 1).

Esempio 18 (riferimento)

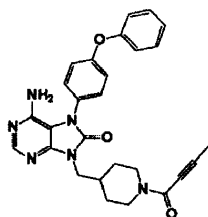
6-ammino-7-(4-fenossifenil)-9-(piperidin-4-ilmetil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one dicloridrato

Il composto del titolo (1,66 g) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto è stato ottenuto seguendo lo stesso modello di processo dell'Esempio 10, usando il composto prodotto nell'Esempio 17 e usando acido p-fenossifenilborico (19 g).

TLC: Rf 0,10 (etil acetato : metanolo : trietilammina= 18 : 2: 1).

Esempio 19 (riferimento)

6-ammino-9-[[1-(2-butinoil)-4-piperidinil]metil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one



Acido 2-butinoico (34 mg), 1-etil-3-(3-dimetilamminopropil)carbodiimmide cloridrato (EDC) (78 mg), 1-idrossibenzotriazolo (HOBt) (62 mg), e trietilammina (114 μ L) sono stati aggiunti a una soluzione in dimetilformammide (3 mL) del composto (100 mg) preparato nell'Esempio 18, cui è seguita agitazione per 3 ore a temperatura ambiente. Alla miscela di reazione è stata aggiunta acqua ed è stata eseguita estrazione con etil acetato. Lo strato organico è stato lavato con una soluzione satura di bicarbonato di sodio e con una soluzione acquosa satura di cloruro di sodio ed è stato quindi essiccato su solfato di sodio anidro, e il solvente è stato rimosso mediante distillazione. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su strato sottile (diclorometano:metanolo: ammoniaca acquosa al 28% = 90 : 10: 1) per ottenere il composto del titolo (75 mg) avente il valore di proprietà fisica indicato sotto.

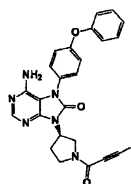
TLC: Rf 0,43 (etil acetato : metanolo = 19 : 1); $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) : δ 1,21-1,45, 1,71-1,83, 1,99, 2,18-2,36, 2,59-2,72, 2,99-3,94, 4,34-4,61, 7,05-7,24, 7,36-7,43, 8,24.

Esempio 19(2)

Il composto esemplificativo indicato sotto è stato ottenuto seguendo lo stesso modello di processo dell'Esempio 9 \rightarrow Esempio 10 \rightarrow Esempio 19, usando il corrispondente derivato amminico di tert-butil (3R)-3-amminopiperidin-1-carbossilato, e usando acido p-fenossifenilborico.

Esempio 19(2)

6-ammino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one



TLC: Rf 0,68 (etil acetato : metanolo = 9 : 1);

¹H-NMR (CDCl₃): δ 1,94-2,03, 2,23-2,39, 2,80-3,01, 3,50-3,63, 3,67-3,80, 3,86-4,02, 4,03-4,18, 4,23-4,33, 4,42-4,51, 5,11-5,25, 7,04-7,23, 7,34-7,45, 8,20-8,23.

[Esempi sperimentali farmacologici] Esempio biologico 1

Misurazione (test in vitro) dell'attività inibitoria su Btk e della selettività per Btk

L'attività inibitoria sull'enzima Btk è stata misurata in base al protocollo fornito dal produttore, usando Btk (Invitrogen Corporation) e il kit Z'-LYTE™ Kinase Assay Kit-Tyr1 peptide (Invitrogen Corporation), che conteneva i seguenti reagenti: peptide Tyr-1, fosfopeptide Thy-1, tampone di chinasi 5x, ATP, reagente di sviluppo B, tampone di sviluppo, e reagente di arresto.

5 µL/pozzetto di una soluzione del composto in esame diluita con dimetil solfossido (DMSO), o DMSO, e 10 µL/pozzetto della soluzione miscela di substrato/enzima sono stati dispensati in una piastra per saggi da 96 pozzetti e la reazione è stata eseguita per 20 minuti a 30 °C. La soluzione miscela di substrato/enzima è stata preparata mediante diluizione con il tampone di chinasi (DL-ditiotreitolo (DTT, 2,7 mM), tampone di chinasi 1,33x) per fornire una concentrazione finale per il peptide Tyr-1 di 4 µM e una concentrazione finale di Btk di 5 nM. 5 µL/pozzetto di adenosina trifosfato (ATP, concentrazione finale = 36 µM) sono stati quindi aggiunti e la reazione è stata eseguita per 1 ora a 30 °C. In seguito al completamento della reazione, 10 µL di una soluzione di sviluppo, fornita diluendo il reagente di sviluppo B a 128x usando il tampone di sviluppo, è stata aggiunta e la reazione è stata eseguita per un'ora aggiuntiva a 30 °C. La reazione enzimatica è stata quindi interrotta aggiungendo 10 µL di soluzione di arresto. L'intensità di fluorescenza a 445 nm e 520 nm in ciascun pozzetto è stata misurata usando un lettore di piastre Fusion Universal Microplate Analyzer (PerkinElmer Inc.). La percentuale di fosforilazione è stata determinata usando il rapporto tra l'emissione a 445 nm (emissione di cumarina) e l'emissione a 520 nm (emissione di fluoresceina) secondo il protocollo fornito con il kit.

La percentuale di inibizione (%) da parte del composto in esame è stata calcolata usando la seguente equazione:

Percentuale di inibizione (%) della fosforilazione =

$$1 - \{ (A_C - A_X) / (A_C - A_B) \} \times 100$$

A_x : % di fosforilazione quando è stato aggiunto il composto

A_B : % di fosforilazione in assenza di aggiunta di ATP (bianco)

A_C : % di fosforilazione quando è stato aggiunto solo DMSO (controllo)

Il valore di inibizione al 50% (valore IC50) per il composto in esame è stato determinato dalla curva di inibizione basata sulla % di inibizione a ciascuna concentrazione di composto in esame.

L'attività inibitoria per altre chinasi (per esempio Lck, Fyn, e LynA (tutte da Invitrogen Corporation) è stata misurata allo stesso modo descritto sopra usando la particolare chinasi al posto di Btk.

Secondo i risultati, i valori di IC50 per i composti della presente invenzione erano, per esempio, 0,007 μ M per il composto dell'Esempio 19(2).

Inoltre, l'attività inibitoria selettiva su Btk dei composti della presente invenzione per altre chinasi, in particolare per Lck, Fyn, e LynA, è stata calcolata come rapporto dei valori di IC50 delle singole chinasi e viene fornita nella Tabella 1 di seguito.

[Tabella 1]

Numero di Esempio	Lck[IC50]/Btk[IC50]	Fyn[IC50]/Btk[IC50]	LynA[IC50]/Btk[IC50]
19(2)	114	762	471

Questi risultati mostrano che i composti della presente invenzione non solo hanno un'attività inibitoria su Btk, ma hanno anche un'attività inibitoria selettiva per Btk rispetto ad altre chinasi.

Esempio biologico 2

Misurazione dell'attivazione delle cellule B o dell'attivazione delle cellule T usando PBMC umane

Una soluzione 10 mmol/L del composto in esame in DMSO è stata dispensata in una piastra da 96 pozzetti (Nunc) ed è stata preparata una serie di diluizioni 5x usando DMSO. Una soluzione di diluizione di composto in esame a concentrazione 100x è stata preparata con un'ulteriore diluizione 10x con terreno RPMI1640 (contenente HI-FBS 10%, penicillina 1%). Cellule mononucleate del sangue periferico umane (PBMC) sono state diluite con il terreno per ottenere una densità di 2×10^6 cellule/mL. 396 μ L della sospensione cellulare sono stati aggiunti a una piastra da 96 pozzetti in cui erano stati già introdotti 4 μ L della soluzione di diluizione di

composto in esame a concentrazione 100x o di solvente (DMSO al 10%) ed è stata eseguita un'incubazione per 10 minuti a 37 °C e con il 5% di CO₂. 10 µL di una soluzione di anticorpo anti-IgM (Southern Biotech)/IL-4 (R & D Systems) o di una sospensione di sfere di anticorpo anti-CD3/CD28 (Invitrogen Corporation) sono stati aggiunti a una piastra da 96 pozzetti e sono stati inoltre aggiunti 90 µL della sospensione cellulare preparata come descritto sopra (concentrazioni finali: anticorpo anti-IgM = 1 µg/mL, IL-4 = 3 ng/mL, e sfere di anticorpo anti-CD3/CD28 = 2×10^6 sfere/mL). 10 µL di terreno sono stati aggiunti ai pozzetti dei campioni non stimolati al posto di queste sostanze stimolanti e sono stati nuovamente posti a riposare a 37 °C e con il 5% di CO₂. L'incubazione è stata realizzata per 16 ore nel caso della valutazione dell'attivazione delle cellule T e per 22 ore nel caso della valutazione dell'attivazione delle cellule B. Sono stati aggiunti 100 µL di Cytofix Buffer (BD Biosciences); è stato eseguito riposo per 15 minuti a 37 °C; è stata realizzata una centrifugazione per 10 minuti a 1500 rpm; e il surnatante è stato rimosso. Sono stati aggiunti 200 µL di Perm buffer II (BD Biosciences) a -20 °C; è stato eseguito riposo per 30 minuti su ghiaccio; è stata realizzata una centrifugazione per 10 minuti a 1500 rpm; e il surnatante è stato rimosso. Sono stati aggiunti 0,5 mL di Stain buffer (BD Biosciences) ed è stata realizzata una centrifugazione per 10 minuti a 1500 rpm. Sono stati aggiunti 100 µL di una soluzione mista di anticorpi ed è stata eseguita una incubazione per 30 minuti su ghiaccio al buio. L'anticorpo era la diluizione 10X con Stain Buffer della miscela 1: 1: 1 di anticorpo anti-CD3 marcato con PerCP (BD Biosciences), anticorpo anti-CD20 marcato con AF488 (BD Biosciences), e anticorpo anti-CD19 marcato con PE (BD Biosciences). Sono stati aggiunti 0,4 mL di Stain Buffer e il surnatante è stato rimosso. Sono stati aggiunti 0,3 mL di Stain Buffer e il precipitato di cellule è stato sospeso per preparare un campione per la misurazione tramite FACS. L'analisi tramite FACS ha usato un FACSCalibur BD (BD Biosciences) e il software per l'analisi dei dati nCELLQuest Versione 3.3 (BD Biosciences). È stato misurato il segnale positivo per CD69 (intensità media di fluorescenza) delle cellule positive per CD20, negative per CD3 (cellule B) o delle cellule positive per CD3, negative per CD20 (cellule T). Dopo aver sottratto il valore del campione non stimolato, è stata determinata la % di inibizione rispetto al valore del campione di controllo non stimolato. La % di inibizione è stata posta in grafico usando Prism (ver. 5.01J, GraphPad Software) ed è stato determinato il valore di IC50.

Secondo i risultati, i valori di IC50 dei composti della presente invenzione per il segnale positivo per CD69 per le cellule B erano, per esempio, 0,061 μM per il composto dell'Esempio 19(2). D'altra parte, i valori di IC50 dei composti della presente invenzione per il segnale positivo per CD69 per le cellule T erano $> 10 \mu\text{M}$ per il composto precedente. Pertanto, è stato mostrato che i composti della presente invenzione hanno un'azione inibitoria selettiva sull'attivazione delle cellule B.

Esempio biologico 3

Valutazione della stabilità nel microsoma epatico di ratto e umano

(1) Preparazione della soluzione di composto in esame

Una soluzione di 0,25 mmol/L è stata preparata diluendo il composto in esame (10 mmol/L soluzione di DMSO, 5 μL) con una soluzione acquosa al 50% di acetonitrile (195 μL).

(2) Preparazione del campione di reazione a 0 minuti

245 μL di un tampone fosfato 0,1 mol/L (pH 7,4) contenente 0,5 mg/mL di microsomi epatici di ratto e umani (XenoTech) e cofattore-NADPH (BD Biosciences) sono stati aggiunti a un reattore che era stato preriscaldato a 37 °C; è stata eseguita una pre-incubazione per 5 minuti; e la soluzione di composto in esame indicata in precedenza (5 μL) è stata aggiunta e la reazione è stata avviata. 20 μL sono stati raccolti immediatamente dopo l'inizio della reazione con l'aggiunta di 180 μL di acetonitrile che contenevano uno standard interno (warfarina). 20 μL di questa soluzione sono stati agitati con 180 μL di una soluzione acquosa al 50% di acetonitrile su una piastra filtro per l'eliminazione delle proteine, cui è seguita filtrazione mediante suzione e il filtrato è stato usato come campione standard.

(3) Preparazione del campione di reazione a 15 minuti

La soluzione di reazione indicata in precedenza è stata incubata per 15 minuti a 37 °C e 20 μL sono stati aggiunti a 180 μL di acetonitrile freddo (contenuto lo standard interno warfarina) per interrompere la reazione. 20 μL di questo sono stati agitati con 180 μL di una soluzione acquosa al 50% di acetonitrile su una piastra filtro per l'eliminazione delle proteine seguita da filtrazione mediante suzione e il filtrato è stato usato come campione standard.

(4) Metodo di valutazione e risultati

Il rapporto residuo (%) è stato calcolato iniettando 1 µL del campione in una LC-MS/MS; dividendo il rapporto dell'area del picco per il campione di reazione (area del picco per il composto in esame/area del picco per lo standard interno) per il rapporto dell'area del picco del campione standard; e moltiplicando il valore risultante per 100.

Sono stati usati come composti in esame i seguenti: composti della presente invenzione e 1-((3R)-3-(4-ammino-3-(4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)-1-piperidinil)-2-propen-1-one (composto comparativo A) e 1-((3S)-3-(4-ammino-3-(4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)-1-pirrolidinil)-2-propin-1-one (composto comparativo B), che sono composti esemplari descritti nel documento brevettuale 1 che hanno uno scheletro di pirazolopirimidina. Il rapporto residuo (%) del composto in esame nel microsoma epatico di ratto e umano era come mostrato nella Tabella 2 di seguito.

[Tabella 2]

Composto	Rapporto residuo (%) nel microsoma epatico di ratto	Rapporto residuo (%) nel microsoma epatico umano
Composto comparativo A	0	0
Composto comparativo B	50,6	55,9
Esempio 19(2)	86,4	100

I risultati mostrano che i composti della presente invenzione sono molto più stabili nei microsomi epatici di ratto e umani rispetto ai composti comparativi.

Esempio biologico 4

Misurazione dell'attività inibitoria su enzimi che metabolizzano farmaci (azione inibitoria su CYP2C8 umano e CYP2C19 umano)

[Metodo sperimentale]

La reazione è stata condotta in una piastra da 96 pozzetti. Le sostanze di controllo positivo (CYP2C8: ketoconazolo, CYP2C19: tranilcipromina) sono state regolate con DMSO (CYP2C8: 0,6 e 6 mmol/L, CYP2C19: 0,9 e 9 mmol/L) a concentrazioni che erano 300 volte la concentrazione finale, e sono state preparate soluzioni (CYP2C8: 8 e 80 µmol/L, CYP2C19: 12 e 120 µmol/L) mediante diluizione 75× con acqua purificata che

conteneva il 2,7% di acetonitrile. I composti in esame sono stati regolati con DMSO a 0,3 e 3 mol/L e sono stati regolati a 4 e 40 µmol/L mediante diluizione 75× con acqua purificata che conteneva il 2,7% di acetonitrile. È stata quindi preparata una miscela di reazione (i valori numerici sono le concentrazioni finali) mediante aggiunta di tampone di potassio fosfato (pH 7,4), cloruro di magnesio (5 mol/L), substrato (CYP2C8: dibenzilfluoresceina 1 µmol/L, CYP2C19: 3-ciano-7-etossicoumarina 25 µmol/L), e microsoma epatico espresso in *E. coli* CYP2C8 (Cypex, 10 pmol/L) e CYP2C19 (Cypex, 3 pmol/L). 100 µL di questa miscela di reazione e 50 µL del composto in esame preparati come descritto sopra e la soluzione controllo positivo preparata come descritto sopra sono stati dispensati in ciascun pozzetto ed è stata eseguita una pre-incubazione per 10 minuti a 37 °C. La reazione è stata avviata aggiungendo 50 µL di soluzione di NADPH (concentrazione finale= 1 mmol/L) ed è stata eseguita una incubazione per 30 minuti a 37 °C. È stata misurata l'intensità di fluorescenza (CYP2C8: lunghezza d'onda di eccitazione = 485 nm, lunghezza d'onda di fluorescenza = 538 nm; CYP2C19: lunghezza d'onda di eccitazione = 409 nm, lunghezza d'onda di fluorescenza = 460 nm) subito dopo l'aggiunta di NADPH e dopo incubazione per 30 minuti. La % di inibizione è stata considerata come la % di calo (% di inibizione) dell'intensità di fluorescenza rispetto a un controllo in cui è stato aggiunto DMSO al posto della soluzione di composto in esame e la reazione è stata realizzata ed è stata calcolata usando la seguente formula:

$$\text{inibizione (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{intensità di fluorescenza dopo la reazione del composto in esame} - \text{intensità di fluorescenza prima della reazione del composto in esame}}{\text{intensità di fluorescenza dopo la reazione del controllo} - \text{intensità di fluorescenza prima della reazione del controllo}} \right) \times 100$$

Il valore di IC50 è stato considerato essere < 1 µM quando la % di inibizione a 1 µmol/L era almeno del 50%; è stato considerato essere > 10 µmol/L quando la % di inibizione a 10 µmol/L non era maggiore del 50%; e tra i valori precedenti (non maggiore del 50% a 1 µmol/L e almeno del 50% a 10 µmol/L) è stata calcolata usando la seguente formula

$$\text{IC50} = (50 - b) / a$$

in cui a e b sono la pendenza e l'intercetta della linea di regressione lineare $y = ax + b$ che passa attraverso i seguenti due punti: la concentrazione di 1 µmol/L, % di inibizione e la concentrazione di 10 µmol/L, % di

inibizione.

I valori di IC50 dei composti comparativi e dei composti della presente invenzione sono stati misurati usando il metodo di misurazione descritto sopra.

I risultati erano i seguenti: per il composto comparativo A e il composto comparativo B, i valori di IC50 per CYP2C8 erano rispettivamente 4,7 μM e 6,9 μM e i valori di IC50 per CYP2C19 erano rispettivamente 5,6 μM e 8,1 μM . D'altra parte, per i composti della presente invenzione, per esempio, il composto dell'Esempio 19(2) aveva valori di IC50 per CYP2C8 e CYP2C19 $> 10 \mu\text{M}$. Pertanto, è stato mostrato che i composti della presente invenzione hanno un'azione inibitoria inferiore su CYP rispetto ai composti comparativi.

Esempio biologico 5

Misurazione della citotossicità e della capacità di ridurre il potenziale della membrana mitocondriale in cellule di epatoma umano in coltura

È noto che il tessuto che si mantiene in equilibrio aerobico, per esempio, i reni e il cuore, e il tessuto che è esposto a elevate concentrazioni di farmaci e che realizza il metabolismo di farmaci, per esempio il fegato, sono sensibili alla disfunzione mitocondriale (Drug Discovery Today, 12 (17-18), 777-785, 2007). La riduzione o l'estinzione del potenziale di membrana mitocondriale da parte di un farmaco è causata dall'inibizione diretta del sistema di trasporto degli elettroni, dal disaccoppiamento del trasporto degli elettroni dalla ATP sintasi o dall'apertura di un poro di transizione di permeabilità sulla membrana mitocondriale. Pertanto, la misurazione del potenziale di membrana mitocondriale in cellule del fegato può fornire un parametro circa l'epatotossicità.

Cellule epatiche umane sono state seminate su una piastra da 96 pozzetti rivestita da collagene a una densità di 30.000 cellule/pozzetto ed è stata realizzata un'incubazione per una notte in un incubatore a 37 °C con CO₂ al 5%, aria al 95%. Le cellule in coltura sono state colorate per 1 ora con 5,5',6,6'-tetraidro-1,1',3,3'-tetrametilbenzamidazolocarboianina ioduro (JC-1) cui è seguito trattamento con il composto in esame. Il composto in esame è stato sciolto in DMSO e quindi diluito nel terreno per coltura liquido Terreno per coltura di epatociti (HCM) e aggiunto alle cellule. Le concentrazioni di trattamento con il composto in esame erano 0, 6,25, 12,5, 25, 50, 100, 200, e 400 $\mu\text{mol/L}$. Dopo esposizione al composto in esame per 24 ore, è stata eseguita la

misurazione con un lettore di piastre SpectraMax (Molecular Devices, LLC) a una lunghezza d'onda di eccitazione di 485 nm e una lunghezza d'onda di fluorescenza di 538 nm e ad una lunghezza d'onda di eccitazione di 544 nm e una lunghezza d'onda di fluorescenza di 590 nm. Il potenziale di membrana è stato determinato dal rapporto tra il valore di misurazione a 544 nm/590 nm e il valore di misurazione a 485 nm/538 nm. Quindi, è stata misurata la concentrazione di ATP nelle cellule usando un kit per saggio luminescente Celltiter Glo (Promega Corporation) al fine di valutare la tossicità cellulare del composto in esame. Le cellule sono state lisate nel tampone di saggio fornito con il kit di misurazione e la concentrazione di ATP rilasciata dalle cellule è stata misurata usando come indicatore l'attività dell'enzima luciferina-luciferasi. L'emissione è stata misurata usando un lettore di piastre SpectraMax. La capacità del composto in esame di ridurre il potenziale della membrana cellulare e la citotossicità del composto in esame sono rappresentate dalla concentrazione (valore di IC50) che ha causato rispettivamente un calo del 50% del potenziale di membrana mitocondriale e della concentrazione di ATP. La capacità di ridurre il potenziale della membrana mitocondriale dei composti in esame e la citotossicità dei composti in esame sono fornite nella Tabella 3 di seguito.

[Tabella 3]

Composto	Capacità di diminuire il potenziale della membrana mitocondriale (IC50 (µM))	Tossicità per cellule epatiche umane (IC50 (µM))
Composto comparativo A	39	78
Composto comparativo B	< 6,25	< 6,25
Esempio 19(2)	200	135

I risultati hanno mostrato che entrambi i valori di IC50 erano inferiori per il composto della presente invenzione rispetto ai composti comparativi.

[Esempi di formulazione]

Esempio di formulazione 1

I componenti indicati sotto sono stati miscelati mediante un metodo standard e quindi pressati in compresse per ottenere 10.000 compresse che contenevano 10 mg del componente attivo in ciascuna compressa.

6-ammino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one 100 g

calcio carbossimetil cellulosa (disintegrante) 20 g

stearato di magnesio (lubrificante) 10 g

cellulosa microcristallina 870 g

APPLICABILITÀ INDUSTRIALE

I composti della presente invenzione sono composti che, oltre ad avere un'attività inibitoria selettiva su Btk, mostrano un'eccellente stabilità metabolica e possono prevenire l'epatotossicità, e pertanto sono utili come agenti terapeutici molto sicuri per malattie cui partecipano cellule B o mastociti.

RIVENDICAZIONI

1. 6-ammino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one, o un suo sale.
2. Composto secondo la rivendicazione 1 che è 6-ammino-9-[(3R)-1-(2-butinoil)-3-pirrolidinil]-7-(4-fenossifenil)-7,9-diidro-8H-purin-8-one.