

TRADUZIONE

Brevetto Europeo No. EP 2 870 157

Domanda di Brevetto Europeo No. 13744836.1

Depositata in data 02 luglio 2013

- 5 Titolo: **“INIBITORI DI PI3K DELTA SELETTIVI”**
Titolare: **Rhizen Pharmaceuticals S.A.**, con sede in Fritz Courvoisier 40, 2300
La Chaux de Fonds / CH

DESCRIZIONE

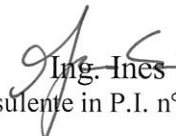
- 10 **[0001]** La presente domanda di brevetto rivendica il vantaggio delle domande di brevetto indiane nn. 2692/CHE/2012, depositata il 4 luglio 2012 e 2693/CHE/2012, depositata il 4 luglio 2012, e delle domande di brevetto provvisorie U.S. nn. 61/691,561, depositata il 21 agosto 2012 e 61/691,586, depositata il 21 agosto 2012.

CAMPO DELL'INVENZIONE

- 15 **[0002]** La presente invenzione si riferisce a inibitori selettivi delle proteine chinasi PI3K delta, metodi per prepararli, composizioni farmaceutiche che li contengono e metodi per trattare e/o prevenire patologie o disturbi mediati dalle chinasi con essi.

CONTESTO DELL'INVENZIONE

- 20 **[0003]** Il fosfatidilinositolo (qui di seguito abbreviato come "PI") è uno di numerosi fosfolipidi riscontrati nelle membrane cellulari. Negli ultimi anni è diventato evidente che il PI svolge un ruolo importante nella trasduzione dei segnali intracellulari. La segnalazione cellulare attraverso fosfoinositidi fosforilati in 3' è stata implicata in una varietà di processi cellulari, ad esempio trasformazione maligna, segnalazione dei fattori di crescita, infiammazione e immunità [Rameh et al. (1999) J. Biol Chem, 274:8347-
25 8350]. L'enzima responsabile della generazione di questi prodotti della segnalazione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

fosforilati, la fosfatidilinositolo 3-chinasi (denominata anche PI 3-chinasi o PI3K), è stato originariamente identificato come un'attività associata alle oncoproteine virali e alle tirosin-chinasi recettoriali dei fattori di crescita che fosforilano il fosfatidilinositolo (PI) e i suoi derivati fosforilati alla posizione 3'-idrossile dell'anello di inositolo
5 (Panayotou et al. (1992) Trends Cell Biol 2:358-60].

[0004] Le fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) sono una famiglia di enzimi che regolano diverse funzioni biologiche in ogni tipo cellulare generando secondi messaggeri di fosfoinositide. Poiché l'attività di questi secondi messaggeri di fosfoinositide viene determinata dal loro stato di fosforilazione, le chinasi e fosfatasi che agiscono per
10 modificare questi lipidi sono fondamentali per la corretta esecuzione degli eventi di segnalazione intracellulari. Fosfoinositide 3-chinasi (PI3K) fosforila i lipidi al residuo 3-idrossile di un anello di inositolo [Whitman et al. (1988) Nature, 332:664] per generare fosfolipidi fosforilati (PIP3) che fungono da secondi messaggeri reclutanti le chinasi con domini di legame lipidici [incluse le regioni di omologia della plecstrina
15 (PH)], come Akt e chinasi-1 dipendente da fosfoinositide (PDK1). Il legame di Akt ai PIP3 di membrana provoca la traslocazione di Akt nella membrana plasmatica, portando Akt a contatto con PDK1, che è responsabile dell'attivazione di Akt. La fosfatasi oncosoppressiva, PTEN, defosforila PIP3 e di conseguenza funge da regolatore negativo dell'attivazione di Akt. Le PI3-Akt chinasi e PDK1 sono importanti nella regolazione di
20 molti processi cellulari, incluse regolazione del ciclo cellulare, proliferazione, sopravvivenza, apoptosi e motilità e sono componenti significativi dei meccanismi molecolari di patologie quali cancro, diabete e infiammazione immunitaria [Vivanco et al. (2002) Nature Rev. Cancer 2:489; Phillips et al. (1998) Cancer 83:41].

[0005] I membri della famiglia di classe I delle PI3K, sono dimeri di una subunità catalitica e una regolatrice. La famiglia di classe I è costituita da quattro isoforme
25

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° U8BM-041R

determinate dalle subunità catalitiche da 110 kDa α , β , γ e δ . Engelman JA, Nat Rev Genet 2006;7:606-19; Carnero A, Curr Cancer Drug Targets 2008;8:187-98; Vanhaesebroeck B, Trends Biochem Sci 2005;30:194-204. La classe I può essere suddivisa in due sottoclassi: Ia, formata dalla combinazione di p110 α , β e δ e una subunità regolatrice (p85, p55 o p50) e Ib, formata dalle subunità regolatrici p110 γ e p101.

[0006] Vi sono notevoli prove indicanti che gli enzimi PI3K di Classe Ia contribuiscono alla oncogenesi in un'ampia varietà di cancro umani, in modo diretto o indiretto [Vivanco and Sawyers, Nature Reviews Cancer, 2002, 2, 489-501; Marone et al., Biochimica et Biophysica Acta 1784 (2008) 159-185]. In particolare, l'isoforma p110 delta è stata implicata nelle funzioni biologiche correlate a patologie immuno-infiammatorie, inclusa la segnalazione dal recettore delle cellule B, recettore delle cellule T, segnalazione di FcR dei mastociti e monociti/macrofagi e funzione osteoclastica/segnalazione di RANKL [Deane J and Fruman D A (2004) Annu Rev. Immunol. 2004. 22:563-98; Janas et al., The Journal of Immunology, 2008, 180: 739-746; Marone R et al., Biochim. Biophys. Acta 2007, 1784:159-185]. La delezione del gene di PI3K delta o l'introduzione selettiva di un mutante di PI3K delta cataliticamente inattivo provoca un'ablazione quasi completa della proliferazione e segnalazione delle cellule B nonché l'indebolimento della segnalazione attraverso le cellule T.

[0007] Sussiste ancora una necessità forte e non soddisfatta di modulatori chinasi a piccole molecole al fine di regolare e/o modulare la trasduzione delle chinasi, in particolare PI3K, per il trattamento di patologie e disturbi associati ad eventi mediati dalle chinasi.

[0008] La pubblicazione internazionale n. WO 2011/055215 e la pubblicazione di brevetto U.S. n. 2011/0118257 descrivono determinati 4H-cromen-4-one 2,3 disostituiti


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

come modulatori di chinasi PI3K e sono incorporate nel presente contesto come riferimento nella loro interezza per tutti gli scopi.


SOMMARIO DELL'INVENZIONE

[0009] La presente invenzione si riferisce a inibitori selettivi di proteine chinasi PI3K delta. Questi composti sono adatti per l'uso in una composizione farmaceutica per il trattamento di una patologia, un disturbo o un'affezione associata/o a PI3K, ad esempio una patologia proliferativa come il cancro.

[0010] In una forma di realizzazione, l'inibitore della PI3K è (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (composto-A1) o un suo sale farmaceuticamente accettabile. In una ulteriore forma di realizzazione, il composto A1 è privo di composto (R)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (composto-A2)

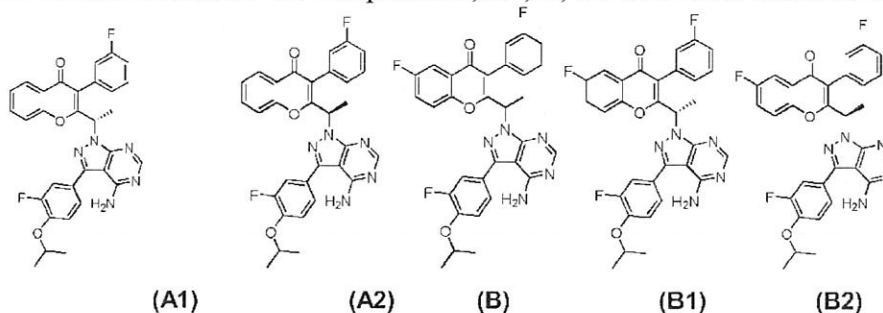
[0011] In una forma di realizzazione, l'inibitore della PI3K è 2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (composto-B) o un suo sale farmaceuticamente accettabile. La presente invenzione include anche il composto-B e i suoi sali farmaceuticamente accettabili, in forma racemica nonché il loro stereoisomero (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (composto-B1), e suoi sali farmaceuticamente accettabili. In una ulteriore forma di realizzazione, il composto B1 è privo di (R)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (composto-B2).

[0012] In una forma di realizzazione, l'inibitore della PI3Kdelta è (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R

fluorofenil)-4H-cromen-4-one 4-metilbenzossolfonato. In un'altra forma di
realizzazione, l'inibitore della PI3K delta è (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-
isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-
cromen-4-one solfato. In un'altra forma di realizzazione, l'inibitore della PI3K delta è
5 (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-
il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one cloridrato. In un'altra forma di
realizzazione, l'inibitore della PI3K delta è (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-
isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-
cromen-4-one benzossolfonato. In un'altra forma di realizzazione, l'inibitore della PI3K
10 delta è (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-
d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one maleato. In un'altra
forma di realizzazione, l'inibitore della PI3K delta è (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-
isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-
cromen-4-one canfora solfonato.

15 **[0013]** Le strutture chimiche dei composti A1, A2, B, B1 e B2 sono mostrate di seguito.



[0014] In una forma di realizzazione preferita, la presente invenzione si riferisce al
composto (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-
d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (composto-A1) o un suo sale
20 farmaceuticamente accettabile.

[0015] In un'altra forma di realizzazione preferita, la presente invenzione si riferisce al

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

composto (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (composto-B1) o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

[0016] L'invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica comprendente uno o più composti della presente invenzione (come il composto A1, B, B1, loro sali farmaceuticamente accettabili, o loro miscele) insieme a un veicolo farmaceuticamente accettabile. La composizione farmaceutica può inoltre comprendere uno o più principi attivi aggiuntivi, come altri agenti attivi (come agenti antitumorali e gli agenti attivi analizzati di seguito). In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica include una quantità terapeuticamente efficace di uno o più composti della presente invenzione.

[0017] L'invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica comprendente il composto A1 insieme a un veicolo farmaceuticamente accettabile.

[0018] L'invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica comprendente il composto B insieme a un veicolo farmaceuticamente accettabile.

[0019] L'invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica comprendente il composto B1 insieme a un veicolo farmaceuticamente accettabile.

[0020] In una forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente il composto A1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui il composto A1 è presente in eccesso rispetto al composto A2

[0021] In una ulteriore forma di realizzazione, il composto A1 è sostanzialmente privo di composto A2.

[0022] In una ulteriore forma di realizzazione, il composto A1 è presente in eccesso rispetto al composto A2 e ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0023] In un'altra forma di realizzazione, l'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente il composto B1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui il composto B1 è presente in eccesso rispetto al composto B2

5 **[0024]** In una ulteriore forma di realizzazione, il composto B1 è sostanzialmente privo di composto B2.

[0025] In una ulteriore forma di realizzazione, il composto B1 è presente in eccesso rispetto al composto B2 e ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

10 **[0026]** Un'altra forma di realizzazione è un composto è un metodo per preparare il sale 4-metilbenzensolfonato (PTSA), solfato (SA), cloridrato (HCl), benzensolfonato, maleato o canfora solfonato del composto B o composto B1. Il metodo può includere la conversione del composto B o B1, o di un suo sale (diverso dal sale desiderato) in un sale 4-metilbenzensolfonato, solfato, cloridrato, benzensolfonato, maleato o canfora solfonato del composto B o composto B1.

15 **[0027]** Un'altra forma di realizzazione è un sale 4-metilbenzensolfonato, solfato, cloridrato, benzensolfonato, maleato o canfora solfonato del composto B o composto B1 adatto per l'uso in una composizione farmaceutica per il trattamento di una patologia, un disturbo o un'affezione associata/o a PI3K, ad esempio una patologia proliferativa come il cancro.

20 **[0028]** L'invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica comprendente sale 4-metilbenzensolfonato, solfato, cloridrato, benzensolfonato, maleato o canfora solfonato del composto B della presente invenzione insieme a un veicolo farmaceuticamente accettabile. La composizione farmaceutica può inoltre comprendere uno o più principi attivi aggiuntivi, come altri agenti attivi (come agenti antitumorali e
25 gli agenti attivi analizzati di seguito). In una forma di realizzazione, la composizione


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

farmaceutica include una quantità terapeuticamente efficace di uno o più composti della presente invenzione.

[0029] L'invenzione fornisce inoltre una composizione farmaceutica comprendente sale 4-metilbenzensolfonato, solfato, cloridrato, benzensolfonato, maleato o canfora solfonato del composto B insieme a un veicolo farmaceuticamente accettabile.

[0030] In una forma di realizzazione, il sale PTSA del composto B o del composto B1 ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

[0031] In una forma di realizzazione, il sale SA del composto B o del composto B1 ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

[0032] In una forma di realizzazione, il sale HCl del composto B o del composto B1 ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

[0033] In una forma di realizzazione, il sale benzensolfonato del composto B o del composto B1 ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

[0034] In una forma di realizzazione, il sale maleato del composto B o del composto B1 ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

[0035] In una forma di realizzazione, il sale canfora solfonato del composto B o del composto B1 ha un eccesso enantiomerico (e.e.) di almeno circa il 60%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% o 99%.

[0036] Un'altra forma di realizzazione è un metodo di inibizione di PI3K delta in un paziente mediante la somministrazione a un paziente di una quantità efficace di

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

composto B o composto B1 della presente invenzione come sale PTSA.

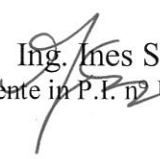
[0037] Un'altra forma di realizzazione è un metodo di inibizione di PI3K delta in un paziente mediante la somministrazione a un paziente di una quantità efficace di almeno un composto della presente invenzione.

5 **[0038]** Ancora un'altra forma di realizzazione è un metodo di trattamento, prevenzione e/o inibizione di una patologia, un disturbo o un'affezione mediata/o dalla proteina chinasi PI3K (come il cancro o altra/o patologia o disturbo proliferativa/o) in un paziente mediante la somministrazione a un paziente di una quantità efficace di almeno un composto della presente invenzione.

10 **[0039]** Ancora un'altra forma di realizzazione è un metodo di trattamento di una patologia, un disturbo o un'affezione associata/o a PI3K in un paziente mediante la somministrazione al paziente di una quantità efficace di almeno un composto della presente invenzione. In una forma di realizzazione, la quantità del composto somministrato è sufficiente a trattare una patologia, un disturbo o un'affezione
15 associata/o a PI3K mediante l'inibizione di PI3K delta.

[0040] Ancora un'altra forma di realizzazione della presente invenzione è un metodo per trattare una patologia proliferativa mediante la somministrazione a un paziente che abbia bisogno di tale trattamento di una quantità efficace di almeno un composto della presente invenzione. In una forma di realizzazione, la quantità del composto
20 somministrato è sufficiente a trattare una patologia proliferativa mediante l'inibizione di PI3K delta.

[0041] Ancora un'altra forma di realizzazione della presente invenzione è un metodo per trattare una patologia proliferativa mediante la somministrazione a un paziente che abbia bisogno di tale trattamento di una quantità efficace di almeno un composto della
25 presente invenzione, in combinazione (contemporaneamente o sequenzialmente) con


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

almeno un altro agente antitumorale. In una forma di realizzazione, la quantità del composto somministrato è sufficiente a trattare la (o facilitare il trattamento della) patologia proliferativa mediante l'inibizione di PI3K delta.

[0042] Ancora un'altra forma di realizzazione è un metodo di trattamento di una patologia, un disturbo o un'affezione associata/o a PI3K in un paziente, comprendente la somministrazione al paziente di una composizione farmaceutica comprendente il Composto A1, B o B1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, opzionalmente miscelato con almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In forme di realizzazione specifiche, la composizione comprende una quantità terapeuticamente efficace di un composto di una qualsiasi delle precedenti forme di realizzazione di Composto A1, B o B1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per il trattamento della patologia, del disturbo o dell'affezione associata/o a PI3K.

[0043] Forme di realizzazione specifiche forniscono un metodo di trattamento del cancro in un paziente comprendente la somministrazione al paziente di una composizione farmaceutica comprendente il composto A1, B o B1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile, opzionalmente miscelato con almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile. In forme di realizzazione specifiche, la composizione comprende una quantità terapeuticamente efficace di un composto di una qualsiasi delle precedenti forme di realizzazione di Composto A1, B o B1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile per il trattamento del cancro in un paziente.

[0044] I composti della presente invenzione sono utili nel trattamento di una varietà di cancri, inclusi, tuttavia senza limitazione, i seguenti:

- carcinoma, incluso quello di vescica, mammella, colon, rene, fegato, polmone (incluso il cancro polmonare a piccole cellule) esofago, cistifellea, utero, ovaio, testicoli, laringe, cavità orale, tratto gastrointestinale (ad esempio esofago,

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

stomaco, pancreas), cervello, cervice, tiroide, prostata, sangue e pelle (incluso carcinoma spinocellulare);

- tumori emopoietici della linea linfoide, inclusi leucemia, leucemia linfocitica acuta, leucemia linfoblastica acuta, linfoma a cellule B, linfoma a cellule T, linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin, linfoma a cellule capellute e linfoma di Burkett;
- tumori emopoietici della linea mieloide, incluse leucemie mielogene acuta e cronica, sindrome mielodisplastica e leucemia promielocitica;
- tumori di origine mesenchimale, incluso fibrosarcoma e rhabdomyosarcoma;
- tumori del sistema nervoso centrale e periferico, inclusi astrocitoma, neuroblastoma, glioma e schwannoma; e
- altri tumori, inclusi melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderma pigmentoso, cheratoacantoma, cancro follicolare della tiroide e sarcoma di Kaposi.

15 **[0045]** I composti della presente invenzione come modulatori dell'apoptosi sono utili nel trattamento, nella prevenzione e nell'inibizione del cancro (inclusi, tuttavia senza limitazione, quei tipi menzionati in precedenza nel presente contesto).


[0046] I composti della presente invenzione sono utili nella chemioprevenzione del cancro. La chemioprevenzione prevede l'inibizione dello sviluppo di cancro invasivo mediante il blocco dell'evento mutageno iniziatore, il blocco della progressione delle cellule pre-maligne che hanno già subito un trauma o l'inibizione di recidiva tumorale. I composti sono anche utili nell'inibizione dell'angiogenesi e delle metastasi tumorali. Una forma di realizzazione dell'invenzione è un metodo di inibizione di angiogenesi o metastasi tumorale in un paziente mediante la somministrazione di una quantità efficace di uno o più composti della presente invenzione.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0047] Un'altra forma di realizzazione della presente è un metodo di trattamento di una patologia correlata al sistema immunitario (ad esempio una malattia autoimmune), una patologia o un disturbo che implica infiammazione (ad esempio asma, broncopneumopatia cronica ostruttiva, artrite reumatoide, malattie infiammatorie croniche intestinali, glomerulonefrite, malattie neuroinfiammatorie, sclerosi multipla, uveite e disturbi del sistema immunitario), cancro o altre patologie proliferative, una epatopatia o un disturbo del fegato, o una nefropatia o un disturbo renale. Il metodo include la somministrazione di quantità terapeuticamente efficace di uno o più composti della presente invenzione.


[0048] Esempi di disturbi immunitari che possono essere trattati dai composti della presente invenzione includono, tuttavia senza limitazione, psoriasi, artrite reumatoide, vasculite, malattie infiammatorie croniche intestinali, dermatite, osteoartrite, asma, miopatie infiammatorie, rinite allergica, vaginite, cistite interstiziale, sclerodermia, osteoporosi, eczema, rigetto dell'innesto di trapianto allogenico o xenogenico (organo, midollo osseo, cellule staminali e altre cellule e tessuti), malattia del trapianto contro l'ospite, lupus eritematoso, malattia infiammatoria, diabete di tipo I, fibrosi polmonare idiopatica (IPF) [o alveolite fibrosante criptogenica (CFA) o polmonite interstiziale fibrosante idiopatica], fibrosi polmonare, dermatomiosite, sindrome di Sjogren, tiroidite (ad esempio tiroidite di Hashimoto e autoimmune), miastenia gravis, anemia emolitica autoimmune, sclerosi multipla, fibrosi cistica, epatite cronica recidivante, cirrosi biliare primitiva, congiuntivite allergica e dermatite atopica.

[0049] Ancora un'altra forma di realizzazione è un metodo di trattamento della leucemia in un paziente mediante la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di un composto della presente invenzione. Ad esempio, i composti della presente invenzione sono efficaci per il trattamento di leucemia linfocitica cronica


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.L. n° USBM-041R

(CLL), linfoma non-Hodgkin (NHL), leucemia mieloide acuta (AML), mieloma multiplo (MM), linfoma a piccoli linfociti (SLL) e linfoma non-Hodgkin indolente (I-NHL).

[0050] Nei summenzionati metodi di trattamento, possono essere somministrati uno o
5 più agenti attivi aggiuntivi con i composti della presente invenzione. Ad esempio, i
composti della presente invenzione sono utili in combinazione (somministrati insieme o
in sequenza) con noti trattamenti antitumorali come chemioterapia, terapia con
radiazioni, terapia biologica, trapianto di midollo osseo, trapianto di cellule staminali o
qualsiasi altra terapia antitumorale o con uno o più agenti citostatici, citotossici o
10 antitumorali o terapia mirata da sola o in combinazione, come ad esempio, tuttavia
senza limitazione, agenti che interagiscono con DNA, come fludarabina, cisplatino,
clorambucile, bendamustina o doxorubicina; agenti alchilanti come ciclofosfamide;
inibitori della topoisomerasi II, come etoposide; inibitori della topoisomerasi I, come
CPT-11 o topotecano; agenti che interagiscono con la tubulina, come paclitaxel,
15 docetaxel o gli epotiloni (ad esempio ixabepilone), presenti in natura o sintetici; agenti
ormonali come tamoxifen; inibitori della timidilato sintasi, come 5-fluorouracile; anti-
metaboliti, come metotrexato; altri inibitori delle tirosin-chinasi come Iressa e OSI-774;
inibitori dell'angiogenesi; inibitori del EGF; inibitori del VEGF; inibitori della CDK;
inibitori della SRC; inibitori del c-Kit; inibitori di Her1/2 e anticorpi monoclonali diretti
20 contro i recettori dei fattori di crescita come erbitux (EGF) ed erceptina (Her2);
anticorpi monoclonali anti-CD20 come rituximab, ublixtumab (TGR-1101),
ofatumumab (HuMax; Intracel), ocrelizumab, veltuzumab, GA101(obinutuzumab),
AME-133v (LY2469298, Applied Molecular Evolution), ocaratuzumab (Mentrik
Biotech), PRO131921, tositumomab, hA20 (Immunomedics, Inc.), ibritumomab-
25 tiuxetan, BLX-301 (Biorex Therapeutics), Reditux (Dr. Reddy's Laboratories) e


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.L. n° USBM-041R

PRO70769 (descritto in WO2004/056312); altri anticorpi monoclonali mirati contro le cellule B come belimumab, atacicept o proteine di fusione come blisibimod e BR3-Fc; altri anticorpi monoclonali come alemtuzumab; CHOP (ciclofosfamide, doxorubicina, vincristina, prednisone); R-CHOP (rituximab-CHOP); hyperCV AD (ciclofosfamide iperfrazionata, vincristina, doxorubicina, desametasone, metotrexato, citarabina); R-hyperCV AD (rituximab-hyperCV AD); FCM (fludarabina, ciclofosfamide, mitoxantrone); R-FCM (rituximab, fludarabina, ciclofosfamide, mitoxantrone); bortezomib e rituximab; temsirolimus e rituximab; temsirolimus e Velcade[®]; Iodio-131 tositumomab (Bexxar[®]) e CHOP-CVP (ciclofosfamide, vincristina, prednisone); R-CVP (rituximab-CVP); ICE (ifosfamide, carboplatino, etoposide); R-ICE (rituximab-ICE); FCR (fludarabina, ciclofosfamide, rituximab); FR (fludarabina, rituximab) e D.T. PACE (desametasone, talidomide, cisplatino, adriamicina, ciclofosfamide, etoposide); e altri modulatori delle proteine chinasi.

[0051] I composti della presente invenzione sono utili anche in combinazione (somministrati insieme o in sequenza) con uno o più farmaci antinfiammatori steroidei, farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS) o derivati antinfiammatori immuno-selettivi (ImSAID).

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

[0052]

La Figura 1 è un grafico a barre delle cellule apoptotiche percentuali dopo il trattamento con il composto B1 o in cellule di pazienti affetti da mieloma multiplo primario come misurate secondo il Saggio 6a.

Le Figure 2A, 2B e 2C sono grafici a barre che mostrano l'induzione di citotossicità (Figura 2A) e di apoptosi (Figura 2B) osservata in cellule di CLL e la corrispondente inibizione di PAkt (Figura 2C) come misurate dal Saggio 8.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

[0053] Come utilizzato nel presente contesto, si applicano le seguenti definizioni tranne se indicato diversamente.

[0054] Alcuni dei composti descritti nel presente contesto contengono uno o più centri
5 asimmetrici e possono pertanto dare origine a enantiomeri, diastereomeri e altre forme stereoisomeriche che possono essere definite in termini di stereochimica assoluta, come (R)- o (S)-. Le presenti entità chimiche, composizioni farmaceutiche e i metodi sono intesi a includere tutti i tali possibili isomeri, inclusi i racemi, le forme otticamente pure e le miscele intermedie. Ad esempio, le miscele intermedie possono includere una
10 miscela di isomeri in un rapporto di circa 10:90, 13:87, 17:83, 20:80 o 22:78. (R)- e (S)- isomeri otticamente attivi possono essere preparati utilizzando sintoni chirali o reagenti chirali, oppure risolti utilizzando tecniche note

[0055] In aggiunta, la presente invenzione include anche composti che differiscono soltanto in presenza di uno o più atomi isotopicamente arricchiti, ad esempio,
15 sostituzione di idrogeno con deuterio o trizio, oppure sostituzione di un atomo di carbonio con carbonio arricchito con ^{13}C o ^{14}C .

[0056] I composti della presente invenzione possono anche contenere proporzioni innaturali di isotopi atomici in corrispondenza di uno o più degli atomi che costituiscono tali composti. Ad esempio, i composti possono essere radiomarcati con
20 isotopi radioattivi, come ad esempio trizio (^3H), iodio-125 (^{125}I) o carbonio-14 (^{14}C). Tutte le variazioni isotopiche dei composti della presente invenzione, che siano radioattive o no, sono comprese nell'ambito della presente invenzione.

[0057] I sali farmaceuticamente accettabili facenti parte della presente invenzione includono sali derivati da basi inorganiche come Li, Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn e Mn;
25 sali di basi organiche quali N,N'-diacetil-etilenediammina, glucammina, trietilammina,

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.F. n° USBM-041R

colina, idrossido, dicicloesilammina, metformina, benzilammina, trialchilammina e
tiamina; sali di basi chirali quali alchilfenilammina, glicinolo e fenil glicinolo; sali di
amminoacidi naturali come glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, norleucina,
5 tirosina, cistina, cisteina, metionina, prolina, idrossi prolina, istidina, monitina, lisina,
arginina e serina; sali di ammonio quaternario dei composti dell'invenzione con
alchilalogenuri, alchilsolfati come MeI e $(Me)_2SO_4$; sali di amminoacidi non naturali
come D-isomeri o amminoacidi sostituiti; sali di guanidina; e sali di guanidina
sostituita in cui i sostituenti sono scelti tra sali di nitro, ammino, alchile, alchenile,
alchinile, ammonio o ammonio sostituito e sali di alluminio. I sali possono includere
10 sali di addizione acida dove appropriato che sono solfati, nitrati, fosfati, perclorati,
borati, idroalogenuri, acetati, tartrati, maleati, citrati, fumarati, succinati, palmoati,
metansolfonati, benzoati, salicilati, benzensolfonati, ascorbati, glicerofosfati e
chetoglutarati. In una forma di realizzazione, il sale è 4-metilbenzensolfonato. In
un'altra forma di realizzazione, il sale è solfato. In ancora un'altra forma di
15 realizzazione, il sale è cloridrato. In ancora un'altra forma di realizzazione, il sale è
benzensolfonato. In ancora un'altra forma di realizzazione, il sale è maleato. In ancora
un'altra forma di realizzazione, il sale è canfora solfonato.

[0058] Quando nel presente contesto vengono utilizzati intervalli per le proprietà fisiche
come il peso molecolare o le proprietà chimiche, come formule chimiche, tutte le
20 combinazioni e sottocombinazioni di intervalli e forme di realizzazione specifiche si
intendono incluse. Il termine "circa" quando riferito a un numero o a un intervallo
numerico indica che il numero o l'intervallo numerico cui si fa riferimento è
un'approssimazione all'interno della variabilità sperimentale (o all'interno dell'errore
sperimentale statistico) e pertanto il numero o l'intervallo numerico può variare ad
25 esempio, tra circa l'1% e il 15% del numero o dell'intervallo numerico dichiarato.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-04TR

5 **[0059]** Il termine "comprendente" (e i termini correlati quali "comprendono" o "comprende" o "avente" o "includente") include, tuttavia senza limitazione, quelle forme di realizzazione, ad esempio, una forma di realizzazione di qualsiasi composizione di materia, composizione, metodo o processo, o simile che "è costituita da" o "costituita essenzialmente da" le caratteristiche descritte.

[0060] I seguenti termini e abbreviazioni hanno i significati indicati di seguito: PI3-K = Fosfoinositide 3-chinasi; PI = fosfatidilinositolo; DNA-PK = Proteina chinasi dipendente dall'acido deossiribonucleico; PTEN = Omologo di fosfatasi e tensina eliminato sul cromosoma Ten; AIDS = Sindrome da immunodeficienza acquisita; HIV
10 = Virus dell'immunodeficienza umana e Mel = metilioduro.

[0061] Le abbreviazioni utilizzate nel presente contesto hanno il loro significato tradizionale all'interno della tecnica chimica e della tecnica biologica, salvo diversa indicazione.

[0062] Il termine "proliferazione cellulare" si riferisce a un fenomeno per il quale il
15 numero di cellule è cambiato come risultato della divisione. Questo termine comprende anche la crescita cellulare per la quale è cambiata la morfologia cellulare (ad esempio ne è aumentata la dimensione) coerentemente a un segnale proliferativo.

[0063] Il termine "co-somministrazione", "somministrazione in combinazione con" e loro equivalenti grammaticali, come utilizzati nel presente contesto, comprende la
20 somministrazione di due o più agenti a un animale così che entrambi gli agenti e/o i loro metaboliti siano presenti nell'animale contemporaneamente. La co-somministrazione include la somministrazione simultanea in composizioni separate, la somministrazione in momenti differenti in composizioni separate o la somministrazione in una composizione in cui sono presenti entrambi gli agenti.

25 **[0064]** Il termine "quantità efficace" o "quantità terapeuticamente efficace" si riferisce a

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

quella quantità di un composto descritto nel presente contesto che è sufficiente a effettuare l'applicazione desiderata incluso, tuttavia senza limitazione, il trattamento della patologia. La quantità terapeuticamente efficace può variare a seconda dell'applicazione desiderata (*in vitro* o *in vivo*), o del soggetto e dell'affezione patologica
5 trattati, ad esempio il peso e l'età del soggetto, la gravità dell'affezione patologica, la modalità di somministrazione e simili, che possono essere facilmente determinati da un esperto della tecnica con competenza ordinaria. Il termine si applica anche a una dose che indurrà una specifica risposta nelle cellule bersaglio, ad esempio riduzione di adesione piastrinica e/o migrazione cellulare. La dose specifica varierà a seconda dei
10 composti specifici scelti, del regime di dosaggio da seguire, da se viene somministrato in combinazione con altri composti, dalla tempistica di somministrazione, dal tessuto al quale viene somministrato e dal sistema di rilascio fisico in cui viene veicolato.

[0065] Come utilizzato nel presente contesto, i termini "trattamento" e "trattare" si riferiscono a un approccio per ottenere risultati benefici o desiderati inclusi, tuttavia
15 senza limitazione, un vantaggio terapeutico e/o un beneficio profilattico. Con beneficio terapeutico si indica eliminazione o miglioramento del disturbo sottostante trattato. Inoltre, un beneficio terapeutico si ottiene con l'eliminazione o il miglioramento di uno o più dei sintomi fisiologici associati al disturbo sottostante in modo da osservare un miglioramento nel paziente, nonostante il fatto che il paziente possa ancora essere
20 affetto dal disturbo sottostante. Per il beneficio profilattico, le composizioni possono essere somministrate a un paziente a rischio di sviluppare una patologia specifica o a un paziente che riporta uno o più dei sintomi fisiologici di una patologia, anche se una diagnosi di questa patologia potrebbe non essere stata eseguita.

[0066] Un "effetto terapeutico", quando tale termine viene utilizzato nel presente
25 contesto, comprende un beneficio terapeutico e/o un beneficio profilattico come

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.P. n° USBM-041R

descritto in precedenza. Un effetto profilattico include ritardare o eliminare l'aspetto di una patologia o affezione, ritardare o eliminare la comparsa dei sintomi di una patologia o affezione, rallentamento, arresto o inversione della progressione di una patologia o affezione, o qualsiasi loro combinazione.

5 **[0067]** Il termine "soggetto" o "paziente" si riferisce a un animale, come un mammifero, ad esempio un essere umano. I metodi descritti nel presente contesto possono essere utili sia in sostanze terapeutiche per esseri umani e applicazioni veterinarie. In alcune forme di realizzazione, il paziente è un mammifero e alcune forme di realizzazione, il paziente è un essere umano. Per le finalità veterinarie, il termine "soggetto" e "paziente"
10 includono, tuttavia senza limitazione, animali da fattoria inclusi mucche, pecore, maiali, cavalli e capre; animali di compagnia come cani e gatti; animali esotici e/o da zoo; animali di laboratorio inclusi topi, ratti, conigli, cavie e criceti; e pollame come polli, tacchini, papere e anatre.

[0068] "Terapia con radiazioni" si riferisce all'esposizione di un paziente, utilizzando
15 metodi e composizioni noti al medico specialista, a emettitori di radiazioni come radionuclidi alfa-emettitori (ad esempio radionuclidi di attinio e torio), emettitori di radiazioni del tipo a basso trasferimento di energia lineare (LET) (vale a dire beta-emettitori), emettitori ai elettroni di conversione (ad esempio stronzio-89 e samario-153-EDTMP), o radiazione di alta energia inclusi, senza limitazione, raggi x, raggi
20 gamma e neutroni.

[0069] "Trasduzione dei segnali" è un processo durante il quale i segnali stimolatori o inibitori sono trasmessi in e all'interno di una cellula per innescare una risposta intracellulare. Un modulatore di un percorso di trasduzione dei segnali si riferisce a un composto che modula l'attività di una o più proteine cellulari mappate sullo stesso
25 percorso di trasduzione del segnale specifico. Un modulatore può aumentare (agonista)

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

o sopprimere (antagonista) l'attività di una molecola di segnalazione.

[0070] Il termine "inibizione selettiva" o "inibire selettivamente" come applicato a un agente biologicamente attivo si riferisce alla capacità dell'agente di ridurre selettivamente l'attività di segnalazione del bersaglio rispetto a un'attività di segnalazione fuori bersaglio, per mezzo dell'interazione diretta o indiretta con il bersaglio.

[0071] Come utilizzato nel presente contesto, il termine "inibitore selettivo di PI3-chinasi δ " si riferisce generalmente a un composto che inibisce l'attività di PI3-chinasi isozima δ in modo più efficace rispetto agli altri isozimi della famiglia di PI3K (alfa, beta e gamma). Ad esempio, l'inibitore selettivo di PI3-chinasi δ può fare riferimento a un composto che mostra una concentrazione inibitoria del 50% (IC50) rispetto alla I PI3-chinasi di tipo delta che è almeno 10 volte, almeno 20 volte, almeno 50 volte, almeno 100 volte, o inferiore rispetto alla IC50 dell'inibitore rispetto al resto delle I PI3-chinasi di altro tipo (vale a dire, alfa, beta e gamma).

[0072] L'inibizione di PI3-chinasi δ può essere di beneficio terapeutico nel trattamento di varie affezioni, ad esempio, affezioni caratterizzate da una risposta infiammatoria incluse, tuttavia, malattie autoimmuni, patologie allergiche e patologie artritiche. Fondamentalmente, l'inibizione della funzione di PI3-chinasi δ non sembra influenzare le funzioni biologiche come la vitalità e la fertilità.

[0073] "Risposta infiammatoria", come utilizzato nel presente contesto, è caratterizzata da rossore, calore, rigonfiamento e dolore (vale a dire, infiammazione) e tipicamente coinvolge lesione o distruzione dei tessuti. Una risposta infiammatoria è solitamente una risposta protettiva localizzata innescata dalla lesione o dal danno dei tessuti che serve a distruggere, diluire o isolare (sequestrare) sia l'agente lesivo sia il tessuto leso. Le risposte infiammatorie sono particolarmente associate all'afflusso di leucociti e/o

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-04TR

chemiotassi leucocitaria (ad esempio neutrofili). Le risposte infiammatorie possono derivare da infezione con organismi patogeni e virus, non infettivo indica ad esempio trauma o riperfusione in seguito a infarto del miocardio o ictus, risposte immunitarie ad antigeni estranei e malattie autoimmuni. Le risposte infiammatorie sottoposte a
5 trattamento con i metodi e i composti secondo l'invenzione comprendono affezioni associate a reazioni del sistema di difesa specifico nonché ad affezioni associate a reazioni del sistema di difesa non specifico.

[0074] I metodi terapeutici dell'invenzione includono metodi per il trattamento di affezioni associate all'attivazione delle cellule infiammatorie. "Attivazione delle cellule
10 infiammatorie" si riferisce all'induzione mediante uno stimolo (inclusi, tuttavia senza limitazione, citochine, antigeni o autoanticorpi) di una risposta cellulare proliferativa, la produzione di mediatori solubili (inclusi, tuttavia senza limitazione, citochine, radicali ossigeno, enzimi, prostanoidei o ammine vasoattive), oppure l'espressione sulla
15 superficie cellulare di nuovi o numeri aumentati di mediatori (inclusi, tuttavia senza limitazione, antigeni di istocompatibilità principali o molecole di adesione cellulare) in cellule infiammatorie [inclusi, tuttavia senza limitazione, monociti, macrofagi, linfociti T, linfociti B, granulociti (leucociti polimorfonucleari inclusi neutrofili, basofili ed eosinofili), mastociti, cellule dendritiche, cellule di Langerhans e cellule endoteliali].
Risulterà chiaro a un esperto della tecnica che l'attivazione di uno o una combinazione
20 di questi fenotipi in queste cellule può contribuire all'iniziazione, perpetrazione o esacerbazione di un'affezione infiammatoria.

[0075] "Malattia autoimmune", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a qualsiasi gruppo di disturbi in cui la lesione tissutale è associata a risposte umorali o cellulo-mediate verso i costituenti propri dell'organismo.

25 [0076] "Rigetto di trapianto", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a una

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

risposta immunitaria diretta contro il tessuto innestato [inclusi organi o cellule (ad esempio midollo osseo)], caratterizzata da una perdita di funzione del tessuto innestato e circostante, dolore, gonfiore, leucocitosi e trombocitopenia.

[0077] "Patologia allergica", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a qualsiasi sintomo, danno tissutale o perdita di funzione tissutale risultante da allergia.

[0078] "Patologia artritica", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a qualsiasi patologia che è caratterizzata da lesioni infiammatorie delle articolazioni attribuibili a una varietà di eziologie.

[0079] "Dermatite", come utilizzato nel presente contesto, si riferisce a una grande famiglia di patologie della pelle che sono caratterizzate dall'infiammazione della pelle attribuibile a una varietà di eziologie.

[0080] I composti della presente invenzione possono essere preparati mediante i metodi descritti nella pubblicazione internazionale n. WO 2011/055215 e nella domanda di brevetto PTC n. PCT/IB2013/053544, depositata il 3 maggio 2013, entrambe incorporate come riferimento nella presente. Il Composto A può essere preparato come descritto nell'Esempio 158 della pubblicazione internazionale n. WO 2011/055215.

Composizioni farmaceutiche

[0081] L'invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente uno o più composti della presente invenzione e uno o più veicoli o eccipienti farmaceuticamente accettabili. In una forma di realizzazione, la composizione farmaceutica include una quantità terapeuticamente efficace di un composto della presente invenzione. La composizione farmaceutica può includere uno o più principi attivi aggiuntivi come descritto nel presente contesto.

[0082] I veicoli e/o eccipienti farmaceutici possono essere scelti tra diluenti, cariche, sali, disgreganti, leganti, lubrificanti, antiagglomeranti, agenti umettanti, matrici a


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

rilascio controllato, coloranti, aromatizzanti, tamponi, stabilizzanti, solubilizzanti e loro combinazioni.

[0083] Le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono essere somministrate da sole o insieme a uno o più altri agenti attivi. Ove desiderato, i
5 composti in oggetto e uno o più altri agenti possono essere miscelati in una preparazione oppure entrambi i componenti possono essere formulati in preparazioni separate per utilizzarli in associazione separatamente o allo stesso tempo.

[0084] I composti e le composizioni farmaceutiche della presente invenzione possono essere somministrati mediante qualsiasi via che consente il rilascio dei composti presso
10 il sito di azione, come via orale, intranasale, topica (ad esempio transdermica), intraduodenale, parenterale (incluse via endovenosa, intrarteriosa, intramuscolare, intravascolare, intraperitoneale o mediante iniezione o infusione), intradermica, per via intramammaria, intratecale, intraoculare, retrobulbare, intrapolmonare (ad esempio farmaci aerosolizzati) o sottocutanea (inclusa somministrazione depot per rilascio a
15 lungo termine, ad esempio incastrato sotto la capsula splenica, nel cervello o nella cornea), sublinguale, anale, rettale, vaginale o mediante impianto chirurgico (ad esempio incastrato sotto la capsula splenica, nel cervello o nella cornea).

[0085] Le composizioni possono essere somministrate in forma solida, semisolida, liquida o gassosa, oppure possono essere in polvere secca, come in forma liofilizzata. Le
20 composizioni farmaceutiche possono essere imballate in forme opportune per il rilascio, incluse, ad esempio, forme di dosaggio solide, come capsule, bustine, cialde, gelatine, cartine, compresse, supposte, pellet, pillole, pastiglie e losanghe. Il tipo di imballaggio generalmente dipenderà dalla via di somministrazione desiderata. Sono anche contemplate formulazioni a rilascio prolungato impiantabili, come le formulazioni
25 transdermiche.



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0086] La quantità del composto da somministrare dipende dal mammifero trattato, dalla gravità del disturbo o dell'affezione, dalla velocità di somministrazione, dalla disposizione del composto e dal parere del medico curante. Tuttavia, un dosaggio efficace rientra nell'intervallo tra circa 0,001 e circa 100 mg per kg di peso corporeo al
5 giorno, preferibilmente tra 1 e circa 35 mg/kg/giorno, in dosi singole o divise. Per un soggetto umano di 70 kg, questa quantità varierebbe da circa 0,05 a 7 g/giorno, preferibilmente da circa 0,05 a circa 2,5 g/giorno. Una quantità efficace di un composto dell'invenzione può essere somministrata in dosi singole o multiple (ad esempio due o tre volte al giorno).

10 [0087] I composti della presente invenzione possono essere utilizzati insieme a uno o più tra agenti antitumorali (ad esempio agenti chemioterapici), anticorpi terapeutici e trattamento con radiazioni.

[0088] I composti della presente invenzione possono essere formulati o somministrati congiuntamente ad altri agenti che agiscono per attenuare i sintomi delle affezioni
15 infiammatorie come encefalomielite, asma e altre patologie descritte nel presente contesto. Questi agenti includono i farmaci antinfiammatori non steroidei (FANS).

[0089] Nella tecnica sono note preparazioni di varie composizioni farmaceutiche. Si vedano ad esempio Anderson, Philip O.; Knoben, James E.; Troutman, William G, a cura di, Handbook of Clinical Drug Data, Decima edizione, McGraw-Hill, 2002; Pratt
20 and Taylor, a cura di, Principles of Drug Action, Terza edizione, Churchill Livingston, New York, 1990; Katzung, a cura di, Basic and Clinical Pharmacology, Nona edizione, McGraw Hill, 2003; Goodman and Gilman, a cura di, The Pharmacological Basis of Therapeutics, Decima edizione, McGraw Hill, 2001; Remingtons Pharmaceutical Sciences, 20^a Edizione, Lippincott Williams & Wilkins., 2000; Martindale, The Extra
25 Pharmacopoeia, Trentaduesima edizione (The Pharmaceutical Press, London, 1999), i



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

quali sono tutti incorporati come riferimento nella loro interezza nel presente contesto.

[0090] Una quantità efficace di un composto dell'invenzione può essere somministrata in dosi singole o multiple mediante qualsiasi delle modalità di somministrazione accettate di agenti aventi utilizzi simili, inclusa per via rettale, boccale, intranasale e
5 transdermica, mediante iniezione intrarteriosa, endovenosa, intraperitoneale, parenterale, intramuscolare, sottocutanea, orale, topica o come un inalante.

[0091] In una forma di realizzazione, il Composto A1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile a una dose scelta per produrre una concentrazione di composto nel sangue tra circa 20 e 5.000 ng/mL, e mantenere tale concentrazione durante un periodo di circa
10 6 - 24 ore in seguito alla somministrazione. In un'altra forma di realizzazione specifica, la dimensione e la frequenza della dose sono scelte per ottenere una concentrazione di composto nel sangue compresa tra circa 50 e 2.500 ng/mL e mantenere quella concentrazione durante un periodo di circa 6 - 24 ore dal momento della somministrazione. In alcune forme di realizzazione, la dimensione e la frequenza della
15 dose sono scelte per ottenere una concentrazione di composto nel sangue che rientra tra circa 100 e 1.500 ng/mL in seguito alla somministrazione. In alcune forme di realizzazione, la dimensione e la frequenza della dose sono scelte per raggiungere una concentrazione di composto nel sangue compresa tra circa 100 e 750 ng/mL per un periodo di circa 6 - 24 ore dal momento della somministrazione. In ulteriori forme di
20 realizzazione, la dimensione e la frequenza della dose sono scelte per ottenere un livello plasmatico di C_{max} , del Composto A1 che è almeno circa 300 ng/mL e non supera circa 10.000 ng/mL

[0092] In una forma di realizzazione, il Composto B1 o un suo sale farmaceuticamente accettabile a una dose scelta per produrre una concentrazione di composto nel sangue
25 tra circa 20 e 5.000 ng/mL, e mantenere tale concentrazione durante un periodo di circa


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

6 - 24 ore in seguito alla somministrazione. In un'altra forma di realizzazione specifica, la dimensione e la frequenza della dose sono scelte per ottenere una concentrazione di composto nel sangue compresa tra circa 50 e 2.500 ng/mL e mantenere quella concentrazione durante un periodo di circa 6 - 24 ore dal momento della somministrazione. In alcune forme di realizzazione, la dimensione e la frequenza della dose sono scelte per ottenere una concentrazione di composto nel sangue che rientra tra circa 100 e 1.500 ng/mL in seguito alla somministrazione. In alcune forme di realizzazione, la dimensione e la frequenza della dose sono scelte per raggiungere una concentrazione di composto nel sangue compresa tra circa 100 e 750 ng/mL per un periodo di circa 6 - 24 ore dal momento della somministrazione. In ulteriori forme di realizzazione, la dimensione e la frequenza della dose sono scelte per ottenere un livello plasmatico di C_{max} , del Composto B1 che è almeno circa 300 ng/mL e non supera circa 10.000 ng/mL

Metodo di trattamento

[0093] L'invenzione fornisce anche metodi di utilizzo dei composti o delle composizioni farmaceutiche della presente invenzione per trattare affezioni patologiche, incluse, tuttavia senza limitazione, patologie associate al malfunzionamento di uno o più tipi di chinasi PI3. Una descrizione dettagliata delle affezioni e dei disturbi mediati dall'attività delle chinasi PI3 δ viene esposta in WO 2001/81346, US 2005/043239, WO 2010/123931, WO 2010/111432 e WO 2010/057048, i quali sono tutti incorporati nel presente contesto come riferimento nelle loro interezze per tutti gli scopi.

[0094] I metodi di trattamento forniti nel presente contesto comprendono la somministrazione al soggetto di una quantità terapeuticamente efficace di un composto dell'invenzione. In una forma di realizzazione, la presente invenzione fornisce un metodo di trattamento di un disturbo, incluse patologie autoimmuni in un mammifero. Il

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.D. n° USBM-041R

metodo comprende la somministrazione a detto mammifero di una quantità terapeuticamente efficace di un composto della presente invenzione.

[0095] I disturbi, le patologie o le affezioni che possono essere trattate con un composto fornito nel presente contesto includono, tuttavia senza limitazione:

- 5 ▪ malattie infiammatorie o allergiche, inclusi disturbo di ipersensibilità e anafilassi sistemica, dermatite atopica, orticaria, allergie ai farmaci, allergie alle punture di insetto, allergie alimentari (inclusa celiachia e simili), anafilassi, malattia da siero, reazioni ai farmaci, allergie al veleno di insetti, polmonite da ipersensibilità, angioedema, eritema multiforme, sindrome di Stevens-Johnson,
- 10 cheratocongiuntivite atopica, cheratocongiuntivite venerea, congiuntivite gigante papillare e mastocitosi;
- malattie infiammatorie croniche intestinali, inclusi morbo di Crohn, colite ulcerosa, ileite, enterite ed enterocolite necrotizzante;
- vasculite e sindrome di Behcet;
- 15 ▪ psoriasi e dermatosi infiammatorie, inclusi dermatite, eczema, dermatite allergica da contatto, patologie cutanee virali, incluse quelle derivate da infezione da papillomavirus, HIV o RLV umano, patologie cutanee da batteri, funghi o altri parassiti, e lupus eritematoso cutaneo;
- asma e patologie allergiche respiratorie, inclusi asma allergico, asma indotto da
- 20 esercizio fisico, rinite allergica, otite media, pneumopatia da ipersensibilità, broncopneumopatia cronica ostruttiva e altri problemi respiratori;
- malattie autoimmuni e affezioni infiammatorie, inclusi, tuttavia senza limitazione, lupus eritematoso, lupus eritematoso sistemico (LES), sclerosi multipla, poliartrite, cirrosi biliare primitiva, psoriasi, artrite reumatoide, artrite psoriasica, artrite gottosa, spondilite, artrite reattiva, glomerulonefrite cronica o
- 25


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

5 acuta, nefrite lupica, sindrome di Reiter, arterite di Takayasu, arterite temporale (nota anche come "arterite gigantocellulare"), infiammazione polmonare autoimmune, tiroidite autoimmune, patologia oculare infiammatoria e autoimmune, vitiligine e vulvodinia. Altri disturbo includono disturbo da riassorbimento osseo e trombosì;

- cancri di mammella, pelle, prostata, cervice, utero, ovaio, testicoli, vescica, polmone, fegato, laringe, cavità orale, colon e tratto gastrointestinale (ad esempio esofago, stomaco, pancreas), cervello, tiroide, sangue e sistema linfatico; e
- 10 ▪ affezioni polmonari o respiratorie incluse, tuttavia senza limitazione, asma, bronchite cronica, rinite allergica, sindrome da distress respiratorio nell'adulto (ARDS), sindrome respiratoria acuta grave (SARS), pneumopatia infiammatoria cronica (ad esempio broncopneumopatia cronica ostruttiva), silicosi, sarcoidosi polmonare, pleurite, alveolite, vasculite, polmonite, bronchiectasie, enfisema
- 15 ereditario e tossicità dell'ossigeno polmonare.

[0096] In determinate forme di realizzazione, il cancro o i cancri che possono essere trattati con i metodi forniti nel presente contesto includono, tuttavia senza limitazione,


- leucemie, incluse, tuttavia senza limitazione, leucemia acuta, leucemia linfocitica acuta, leucemie mielocitiche acute, come leucemie mieloblastica, promielocitica, mielomonocitica, monocitica, eritroleucemia e sindrome
- 20 mielodisplastica o un relativo sintomo (come anemia, trombocitopenia, neutropenia, bicitopenia o pancitopenia), anemia refrattaria (RA), RA con sideroblasti anulati (RARS), RA con blasti in eccesso (RAEB), RAEB in trasformazione (RAEB-T), preleucemia e leucemia mielomonocitica cronica
- 25 (CMML);

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R


- leucemie croniche, incluse, tuttavia senza limitazione leucemia mielocitica (granulocitica) cronica, leucemia linfocitica cronica e leucemia a cellule capellute;
- policitemia vera;
- 5 ▪ linfomi, inclusi, tuttavia senza limitazione, malattia di Hodgkin e malattia non-Hodgkin;
- mieloma multipli, inclusi, tuttavia senza limitazione, mieloma multiplo smoldering (quiescente), mieloma non secretorio, mieloma osteosclerotico, leucemia plasmacellulare plasmocitoma solitario e plasmocitoma extramidollare;
- 10 ▪ macroglobulinemia di Waldenstrom;
- gammopatia monoclonale di significatività non determinata;
- gammopatia monoclonale benigna;
- malattia delle catene pesanti;
- 15 ▪ sarcoma dei tessuti ossei e connettivi, inclusi, tuttavia senza limitazione, sarcoma osseo, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma di Ewing, tumore gigantomaligno, fibrosarcoma dell'osso, cordoma, sarcoma periostale, sarcomi dei tessuti molli, angiosarcoma (emangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma di Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, cancro metastatici, neurilemmoma, rhabdomyosarcoma e sarcoma sinoviale;
- 20 ▪ tumori cerebrali inclusi, tuttavia senza limitazione, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefalico, ependimoma, oligodendroglioma, tumore non gliale, neurinoma acustico, craniofaringioma, medulloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma e linfoma cerebrale primitivo;
- 25 ▪ cancro della mammella, inclusi, tuttavia senza limitazione, adenocarcinoma, carcinoma lobulare (a piccole cellule), carcinoma intradottale, cancro mammario

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.R. n° USBM-041R

- midollare, cancro mammario tubolare, cancro mammario papillare, cancri primitivi, malattia di Paget e cancro mammario infiammatorio;
- cancro surrenale, inclusi, tuttavia senza limitazione, feocromocitoma e carcinoma corticosurrenale;
- 5
- cancro tiroideo, inclusi, tuttavia senza limitazione, cancro papillare o follicolare della tiroide, cancro midollare della tiroide e cancro anaplastico della tiroide;
 - cancro pancreatico, inclusi, tuttavia senza limitazione, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumore secernente somatostatina e carcinoide o tumore a
- 10
- cellule insulari;
 - cancro pituitario, inclusi, ma limitatamente a, malattia di Cushing, tumore prolattina-secernente, acromegalia e diabete insipido;
 - cancro dell'occhio, inclusi, tuttavia senza limitazione, melanoma oculare, come melanoma dell'iride, melanoma coroideale e melanoma del corpo ciliare e
- 15
- retinoblastoma;
 - cancro vaginale, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma spinocellulare, adenocarcinoma e melanoma;
 - cancro vulvare, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma spinocellulare, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma basocellulare, sarcoma e malattia di
- 20
- Paget;
 - cancri della cervice, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma spinocellulare e adenocarcinoma;
 - cancro uterino, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma endometriale e sarcoma uterino;
- 25
- cancro ovarico, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma dell'epitelio


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

- ovarico, tumore borderline, tumore a cellule germinali e tumore stromale;
- cancro esofageo, inclusi tuttavia senza limitazione, cancro squamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide-cistico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenosquamoso, sarcoma, melanoma, plasmocitoma, carcinoma verrucoso e carcinoma a cellule a chicco d'avena (piccole cellule);
 - cancro dello stomaco, inclusi, tuttavia senza limitazione, adenocarcinoma, linfoma maligno, liposarcoma, fibrosarcoma e carcinosarcoma fungiforme (polipoide), ulcerante, a diffusione superficiale, a diffusione diffusa;
 - cancro del colon;
 - 10 ▪ cancro del retto;
 - cancro del fegato, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma epatocellulare ed epatoblastoma;
 - cancro della cistifellea, incluso, tuttavia senza limitazione, l'adenocarcinoma;
 - colangiocarcinomi, inclusi, tuttavia senza limitazione, papillare, nodulare e
15 diffuso;
 - cancro polmonare, inclusi, tuttavia senza limitazione, cancro polmonare non a piccole cellule, carcinoma spinocellulare (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma a cellule grandi e carcinoma polmonare a piccole cellule;
 - 20 ▪ cancro testicolare, inclusi, tuttavia senza limitazione, tumore germinale, seminoma, anaplastico, classico (tipico), spermatocitico, nonseminoma, carcinoma embrionale, carcinoma teratoma e coriocarcinoma (tumore del sacco vitellino);
 - cancro della prostata, inclusi, tuttavia senza limitazione, adenocarcinoma,
25 leiomiosarcoma e raiomiosarcoma;


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

- cancro del pene;
- cancro orale, incluso, tuttavia senza limitazione, il carcinoma spinocellulare;
- cancro basale;
- cancro della ghiandola salivare, inclusi, tuttavia senza limitazione, adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoido-cistico;
- 5 ▪ cancro della faringe, inclusi, tuttavia senza limitazione, cancro spinocellulare e verrucoso;
- cancro della pelle, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma basocellulare, carcinoma e melanoma spinocellulare, melanoma a diffusione superficiale, melanoma nodulare, melanoma lentigo maligna e melanoma acrale lentiginoso;
- 10 ▪ cancro del rene, inclusi, tuttavia senza limitazione, cancro a cellule renali, adenocarcinoma,
- ipernefroma, fibrosarcoma e cancro a cellule transizionali (pelvi renali e/o uretere);
- 15 ▪ tumore di Wilms;
- cancro della vescica, inclusi, tuttavia senza limitazione, carcinoma a cellule transizionali, cancro spinocellulare, adenocarcinoma e carcinosarcoma; e altri cancri, inclusi, non limitatamente a, mixosarcoma, sarcoma osteogenico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma,
- 20 emangioblastoma, carcinoma epiteliale, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogenico, carcinoma delle ghiandole sudoripare, carcinoma delle ghiandole sebacee, carcinoma papillare e adenocarcinomi.

Si vedano Fishman et al., 1985, Medicine, 2^a Edizione, J.B. Lippincott Co., Philadelphia e Murphy et al., 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, and Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., Inc., United States

25

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.L. n° USBM-041R

of America.

[0097] Si comprenderà che i metodi di trattamento dell'invenzione sono utili nei campi della medicina umana e della medicina veterinaria. Pertanto, l'individuo da trattare può essere un mammifero, preferibilmente un essere umano, o altri animali. Per le finalità veterinarie, "individui" include, tuttavia senza limitazione, animali da fattoria inclusi mucche, pecore, maiali, cavalli e capre; animali di compagnia come cani e gatti; animali esotici e/o da zoo; animali di laboratorio inclusi topi, ratti, conigli, cavie e criceti; e pollame come polli, tacchini, papere e anatre.

[0098] L'invenzione si riferisce anche a un metodo di trattamento di un disturbo iperproliferativo in un soggetto che comprende la somministrazione a detto mammifero di una quantità terapeuticamente efficace di un composto della presente invenzione o di un suo sale farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, detto metodo è correlato al trattamento di cancro come leucemia mieloide acuta, cancro del timo, del polmone, spinocellulare, della pelle, dell'occhio, retinoblastoma, melanoma intraoculare, della cavità orale e orofaringea, della vescica, gastrico, dello stomaco, pancreatico, della vescica, della mammella, della cervice, della testa, del collo, renale, del rene, del fegato, ovarico, della prostata, coloretale, esofageo, testicolare, ginecologico, tiroideo, CNS, PNS, correlato ad AIDS (ad esempio linfoma e sarcoma di Kaposi) o cancro indotto da virus. In alcune forme di realizzazione, detto metodo si riferisce al trattamento di un disturbo iperproliferativo non canceroso come l'iperplasia benigna della cute (ad esempio psoriasi), restenosi o prostata (ad esempio ipertrofia prostatica benigna, IPB).

ESEMPI

[0099] Gli esempi e le preparazioni fornite di seguito illustrano ed esemplificano ulteriormente i metodi di preparazione dei composti dell'invenzione. Occorre

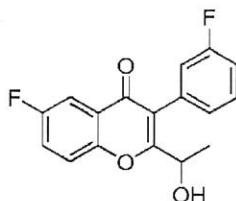
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.L. n° USBM-041R

comprendere che l'ambito della presente invenzione non è limitato in alcun modo dall'ambito dei seguenti esempi e preparazioni. Nei seguenti esempi, molecole con un singolo centro chirale, tranne se diversamente indicato, esistono come racemo. Singoli enantiomeri possono essere ottenuti mediante metodi noti agli esperti della tecnica.

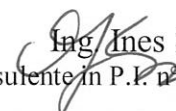
- 5 **[0100]** Se non diversamente menzionato, il work-up si riferisce alla distribuzione della miscela di reazione tra le fasi acquosa e organica indicate tra parentesi, la separazione e l'essiccamento su Na₂SO₄ dello strato organico e l'evaporazione del solvente per dare un residuo. Salvo diversa indicazione, la purificazione implica cromatografia su colonna impiegando gel di silice come fase stazionaria e una miscela di etere di petrolio (che
10 bolle a 60-80 °C) ed etilacetato o diclorometano e metanolo di polarità adatta come fasi mobili. TA si riferisce alla temperatura ambiente (25-28 °C).

Intermedio 1

[0101]



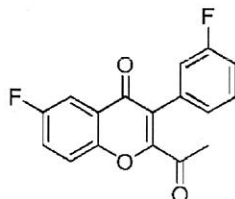
- 15 **[0102]** Intermedio 1: 6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-idrossietil)-4H-cromen-4-one: a una soluzione di 2-(1-bromoetil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (15,0 g, 40,84 mmol) in DMSO (150 ml), è stato addizionato n-butanolo (7,5 ml) ed è stata riscaldata a 120 °C per 3 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a TA, spenta con
20 acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (7,90 g, 64%). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 7,85 (dd, J = 8,1, 3 Hz, 1H), 7,54 (dd, J = 9,2, 4,2 Hz, 1H), 7,47-7,37 (m, 2H), 7,15-6,98 (m,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.F. n° USBM-041R

3H), 4,74 (quintetto, $J = 6,8$ Hz, 1H), 2,23 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 1,54 (d, $J = 6,6$ Hz, 3H).

Intermedio 2

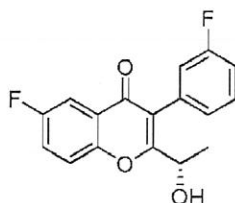
[0103]



5 [0104] Intermedio 2: 2-acetil-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one: DMSO (5,60 ml, 79,14 mmol) è stato addizionato a diclorometano (40 ml) raffreddata a -78 °C, seguito da ossalile cloruro (3,40 ml, 39,57 mmol). Dopo 10 minuti, l'intermedio 1 (6,00 g, 19,78 mmol) in diclorometano (54 ml) è stato addizionato a gocce e agitato per 20
10 minuti. È stata addizionata trietilammina (12 ml) ed agitata per 1 ora. La miscela di reazione è stata spenta con acqua ed estratta con diclorometano. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto come un solido giallo (4,2 g, 71%) che è stato utilizzato così com'era nella fase successiva.

15 Intermedio 3

[0105]



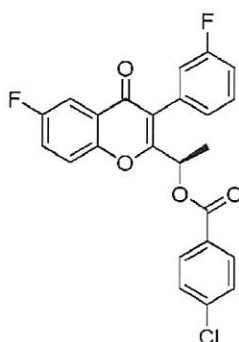
[0106] Intermedio 3: (S)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-idrossietil)-4H-cromen-4-one: all'intermedio 2 (2,00 g, 6,66 mmol), è stato addizionato R-Alpine borano (0,5 M in
20 THF, 20 ml) ed è stato riscaldato a 60 °C per 20 ore. La miscela di reazione è stata spenta con 2 N HCl acquoso ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (1,51 g, 75%). Eccesso enantiomerico: 94,2%, arricchito con isomero a eluizione rapida (tempo di ritenzione: 5 8,78 min.) come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak.

Intermedio 4

[0107]



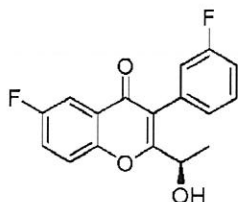
[0108] Intermedio 4: (R)-1-(6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4-osso-4H-cromen-2-il)etil 4-
10 clorobenzoato: a una soluzione di intermedio 3 (1,45 g, 4,78 mmol) in THF (15 ml),
sono stati addizionati acido 4-clorobenzoico (0,748 g, 4,78 mmol) e trifetilfosfina (1,88
g, 7,17 mmol) e sono stati riscaldati a 45 °C seguiti da diisopropilazodicarbossilato (1,4
ml, 7,17 mmol). Dopo 1 ora, la miscela di reazione è stata concentrata e il residuo è
15 dare il composto come un solido bianco sporco (1,81 g, 86%) che è stato utilizzato
senza purificazione nella fase successiva.

Intermedio 5

Metodo A

[0109]

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-041R



[0110] Intermedio **5**: (R)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-2-(1-idrossietil)-4H-cromen-4-one: all'intermedio **4** (1,75 g, 3,96 mmol) in metanolo (17 ml) raffreddato a 10 °C, è stato addizionato carbonato di potassio (0,273 g, 1,98 mmol) ed è stato agitato per 30 minuti.

5 La miscela di reazione è stata concentrata, acidificata con soluzione di HCl da 2 N, estratta con etilacetato, essiccata su solfato di sodio e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido giallo (1,05 g, 87%). Eccesso enantiomerico: 93,6%, arricchito con isomero a eluizione tardiva (tempo

10 di ritenzione: 11,12 min.) come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak.

Metodo B:

[0111] Fase-1: (R)-2-(1-(benzilossi)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one: a 1-(5-fluoro-2-idrossifenil)-2-(3-fluorofenil)etanone (11,00 g, 44,31 mmol) in

15 diclorometano, HATU (33,7 g, 88,63 mmol) e acido R-(+)-2-benzilossipropionico (9,58 g, 53,17 mmol) sono stati addizionati e agitati per 10 minuti. È stata addizionata trietilammina (66,7 ml, 0,47 mol) a gocce e agitata a temperatura ambiente per 24 ore. La miscela di reazione è stata spenta con acqua, estratta con diclorometano, essiccata su solfato di sodio e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato

20 mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido giallo (10,5 g, 60%). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 7,85 (dd, J = 8,1,3 Hz, 1H), 7,58 (dd, J = 9,1, 4,1 Hz, 1H), 7,47-7,39 (m, 1H), 7,39-7,34 (m, 1H), 7,28-7,20 (m, 3H), 7,20-7,14 (m, 2H), 7,16-7,07 (m, 1H), 6,99-6,89 (m, 2H),

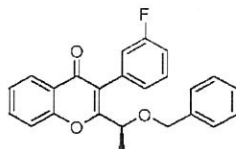
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.A. n° USBM-04TR

4,50-4,31 (m, 3H), 1,56 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

[0112] Fase-2: (R)-2-(1-(benzilossi)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (10,5 g, 26,69 mmol) in diclorometano (110 ml) raffreddato a 0 °C, è stato addizionato cloruro di alluminio (5,35 g, 40,03 mmol) in porzioni e agitato a TA per 6 ore. La miscela di reazione è stata spenta con soluzione di HCl da 2 N, estratta con diclorometano, essiccata su solfato di sodio e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare l'intermedio desiderato come un solido giallo (6,1 g, 76%). Eccesso enantiomerico: 97,7%, arricchito con isomero a eluizione tardiva (tempo di ritenzione: 11,12 min.) come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak.

Intermedio 6

[0113]



[0114] Intermedio 6: (R)-2-(1-(benzilossi)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one: a 2-(3-fluorofenil)-1-(2-idrossifenil)etanone (10,0 g, 43,43 mmol) in diclorometano, HATU (33,0 g, 86,86 mmol) e acido R-(+)-2-benzilossipropionico (9,39 g, 52,12 mmol) sono stati addizionati e agitati per 10 minuti. È stata addizionata trietilammina (65,4 ml, 0,469 mol) a gocce e agitata a temperatura ambiente per 24 ore. La miscela di reazione è stata spenta con acqua, estratta con diclorometano, essiccata su solfato di sodio e concentrata a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (9,0 g, 55%). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,23 (dd, $J = 7,9, 1,2$ Hz, 1H), 7,74-7,70 (m, 1H), 7,58 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H), 7,43 (t, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,37 (q, $J = 7,2$ Hz, 1H), 7,29-7,15 (m, 5H), 7,09 (dt, $J = 8,6, 1,7$ Hz, 1H), 7,00-

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

6,90 (m, 2H), 4,51-4,35 (m, 3H), 1,57 (d, $J = 6,4$ Hz, 3H).

Intermedio 7

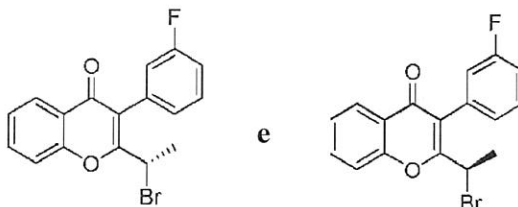
[0115]



- 5 [0116] Intermedio 7: (R)-3-(3-fluorofenil)-2-(1-idrossietil)-4H-cromen-4-one: all'intermedio 6 (5,0 g, 13,35 mmol) in diclorometano (50 ml) raffreddato a -78 °C, è stato addizionato a gocce tribomuro di boro (1 M in diclorometano, 36,5 ml, 0,145 mmol) ed è stato agitato per 1 ora. La miscela di reazione è stata spenta con soluzione di HCl da 2 N, estratta con diclorometano, essiccata su solfato di sodio e concentrata a
- 10 pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare l'intermedio II come un solido bianco sporco (3,05 g, 80%). $^1\text{H-NMR}$ (δ ppm, CDCl_3 , 400 MHz): 8,24 (dd, $J = 7,9,1,5$ Hz, 1H), 7,73 (m, 1H), 7,54 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,44 (m, 2H), 7,13-7,01 (m, 3H), 4,71 (q, $J = 6,6$ Hz, 1H), 1,56 (d, $J = 6,5$ Hz, 3H). Massa: 284,9 (M^+). Purezza: 99,73%. $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -
- 15 0,605 ($c = 1$, CHCl_3). Eccesso enantiomerico: 95,2%, arricchito con isomero a eluizione tardiva (tempo di ritenzione: 10,19 min.) come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak.

Intermedi 7a e 7b

[0117]



20

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.L. n° USBM-041R

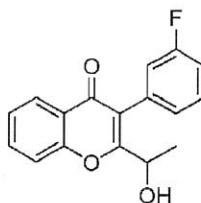
[0118] Intermedi 7a e 7b: (S)-2-(1-bromoetil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one e (R)-2-(1-bromoetil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one: i due isomeri enantiomericamente puri sono stati separati mediante condizioni di SFC preparativa da 2-(1-bromoetil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (10 g) utilizzando CO₂:MeOH e analizzati su una colonna C18 XBridge (50 x 4,6 mm; 3,5µm) utilizzando acqua (10 mM bicarbonato di ammonio):acetonitrile (gradiente: acetonitrile al 5%-95% in 1,2 min.) come fase mobile a una portata di 2,0 ml/min.

Intermedio 7a: solido bianco sporco (3,80 g). e.e. 100%. TA: 1,79 min. Massa: 348,9 (M⁺+1).

10 Intermedio 7b: solido bianco sporco (3,8 g). e.e. 100%. TA: 1,79 min. Massa: 348,9 (M⁺+1).

Intermedio 8

[0119]

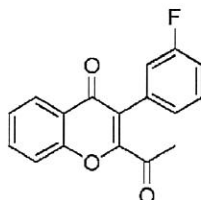


15 [0120] Intermedio 8: 3-(3-fluorofenil)-2-(1-idrossietil)-4H-cromen-4-one: a una soluzione di 2-(1-bromoetil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (30 g, 86,51 mmol) in DMSO (300 ml), n-butano (15 ml) è stato addizionato e riscaldato a 120 °C per 3 ore. La soluzione di reazione è stata raffreddata a TA, spenta con acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a
20 pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto come un solido bianco sporco (16 g, 64%) che è stato utilizzato così com'era nella fase successiva.

Intermedio 9

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

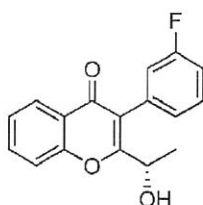
[0121]



[0122] Intermedio 9: 2-acetil-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one: DMSO (16,0 ml, 227 mmol) è stato addizionato a diclorometano (200 ml) raffreddata a -78 °C, seguito da ossalile cloruro (9,80 ml, 113,5 mmol). Dopo 10 minuti, l'intermedio 8 (16,2 g, 56,79 mmol) in diclorometano (54 ml) è stato addizionato a gocce e agitato per 20 minuti. È stata addizionata trietilammina (32 ml) ed agitata per 1 ora. La miscela di reazione è stata spenta con acqua ed estratta con diclorometano. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido giallo (8,2 g, 51%). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,26 (dd, *J* = 8,0,1,5 Hz, 1H), 7,79 (m, 1H), 7,58 (d, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,50 (dt, *J* = 8,0,0,8 Hz, 1H), 7,41 (m, 1H), 7,15 (m, 1H), 7,01 (m, 2H), 2,37 (s, 3H).

Intermedio 10

15 [0123]



[0124] Intermedio 10: (S)-3-(3-fluorofenil)-2-(1-idrossietil)-4H-cromen-4-one: all'intermedio 8 (1,00 g, 3,53 mmol) in THF (2 ml), è stato addizionato R-Alpine borano (0,5 M in THF, 10 ml) ed è stato riscaldato a 60 °C per 20 ore. La miscela di reazione è stata spenta con 2 N HCl acquoso ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (0,400 g, 40%). Eccesso enantiomerico: 94,8%, arricchito con isomero a eluizione rapida (tempo di ritenzione: 8,71 min.) come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak.

5 **Intermedio 11**

[0125] Intermedio 11: 4-bromo-2-fluoro-1-isoprossibenzene: a una soluzione di intermedio 4-bromo-2-fluorofenolo (10 g, 52,35 mmol) in THF (100 ml), sono stati addizionati alcol isopropilico (4,8 ml, 62,62 mmol) e trifenilfosfina (20,6 g, 78,52 mmol) e sono stati riscaldati a 45 °C seguiti da diisopropilazodicarbossilato (15,4 ml, 78,52 mmol). La miscela è stata tenuta a riflusso per 1 ora, concentrata e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto come un liquido incolore (13,1 g, 99%) che è stato utilizzato senza purificazione nella fase successiva.

Intermedio 12

15 [0126] Intermedio 12: 2-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolano: acetato di potassio (10,52 g, 107,2 mmol) e bis(pinacolato)diboro (15 g, 58,96 mmol) sono stati addizionati a una soluzione di intermedio 11 (10,52 g, 107,2 mmol) in diossano (125 ml), e la soluzione è stata degassificata per 30 minuti. [1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloro palladio(II).CH₂Cl₂ (4,4 g, 5,36 mmol) è stato
20 addizionato in atmosfera di azoto e riscaldato a 80 °C. Dopo 12 ore, la miscela di reazione è stata filtrata attraverso celite e concentrata. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto come un olio giallo (13,9 g, 99%) che è stato utilizzato senza purificazione nella fase successiva.

25 **Intermedio 13**


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

[0127] Intermedio 13: 3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina: a una soluzione di 3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (11,0 g, 42,14 mmol) in DMF (110 ml), etanolo (55 ml) e acqua (55 ml), sono stati addizionati intermedio **12** (23,4 g, 84,28 mmol) e carbonato di sodio (13,3 g, 126,42 mmol) e
5 degassificati per 30 minuti. Tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0) (2,4 g, 2,10 mmol) è stato addizionato in atmosfera di azoto e riscaldato a 80 °C. Dopo 12 ore, la miscela di reazione è stata filtrata attraverso celite, concentrata ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato triturato con dietilere, filtrato ed essiccato sottovuoto
10 a dare il composto come un solido marrone chiaro (3,2 g, resa del 26%) che è stato utilizzato così com'era nella fase successiva.

Esempio A

2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one

15 **[0128]** Il composto del titolo viene preparato come descritto nell'Esempio 158 della pubblicazione internazionale n. WO 2011/055215.

Esempio A1

(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one

20 **[0129]** A una soluzione di intermedio 13 (3,35 g, 11,60 mmol) in THF (2,0 ml), sono stati addizionati intermedio **7** (3,00 g, 10,55 mmol) e trifenilfosfina (5,57 g, 15,82 mmol) e agitati a TA per 5 minuti. Diisopropilazodicarbossilato (3,2 ml, 15,82 mmol) è stato addizionato riscaldato a 45 °C. Dopo 2 ore, la miscela di reazione è stata spenta con acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di
25 sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° 258M-041R

cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (2,79 g, 48%). PF: 200-203 °C. Massa: 554,3 ($M^+ + 1$). Eccesso enantiomerico: 94,0% come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak, arricchito con isomero a eluizione rapida (tempo di ritenzione = 12,63 min.).

Esempio A2

Metodo 1

(R)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one

10 **[0130]** All'intermedio **13** (0,039 g, 0,143 mmol), è stato addizionato idrossido di cesio (0,013 g, 0,074 mmol) in etanolo e tenuto a refluxo per 30 minuti. Il solvente è stato concentrato e il residuo è stato disciolto in DMF (0,5 ml). L'Intermedio 7a (0,050 g, 0,143 mmol) è stato addizionato e agitato a temperatura ambiente per 4 ore. La miscela di reazione è stata diluita con acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato
15 essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con metanolo:diclorometano a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (0,025 g, 231%). PF: 205-207 °C. Massa: 554,3 ($M^+ + 1$). Eccesso enantiomerico: 74,0% come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak, arricchito con isomero a eluizione tardiva
20 (tempo di ritenzione = 14,77 min.).

Metodo 2

(R)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one

[0131] A una soluzione di intermedio **13** (0,143 g, 0,527 mmol) in THF (7,5 ml), sono stati addizionati intermedio **10** (0,150 g, 0,527 mmol) e trifenilfosfina (0,200 g, 0,791

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-04TR

mmol) e agitati a TA per 5 minuti. Diisopropilazodicarbossilato (0,15 ml, 0,791 mmol) è stato addizionato riscaldato a 45 °C. Dopo 3 ore, la miscela di reazione è stata spenta con acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante
5 cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (0,035 g, 12%). PF: 204-206°C. Massa: 554,3 (M⁺+1). Eccesso enantiomerico: 98,8% come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak, arricchito con isomero a eluizione tardiva (tempo di ritenzione = 14,77 min.).

10 **Esempio B**

2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one

[0132] A una soluzione di intermedio **13** (0,080 g, 0,293 mmol) in DMF (2 ml), è stato addizionato carbonato di potassio (0,081 g, 0,587 mmol) e agitato a TA per 10 minuti.
15 A questa miscela è stato addizionato l'intermedio 2-(1-bromoetil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (0,215 g, 0,587 mmol) e agitato per 12 ore. La miscela di reazione è stata diluita con acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con metanolo:diclorometano a dare il
20 composto del titolo come un solido giallo chiaro (0,045 g, 270%). MP,175-177°C, ¹H-NMR (δ ppm, DMSO-D₆, 400 MHz): δ 8,20 (s, 1H), 7,85 (dd, *J* = 8,1, 3,0 Hz, 1H), 7,48-7,33 (m, 5H), 7,14 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,02 (m, 2H), 6,90 (m, 1H), 6,10 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 4,64 (quintetto, *J* = 6,0 Hz, 1H), 1,99 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,42 (d, *J* = 6,1 Hz, 6H).

25 **Esempio B1**

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one

[0133] A una soluzione di intermedio 13 (0,134 g, 0,494 mmol) in THF (2,0 ml), sono stati addizionati intermedio 5 (0,150 g, 0,494 mmol) e trifenilfosfina (0,194 g, 0,741 mml) e agitati a TA per 5 minuti. Diisopropilazodicarbossilato (0,15 ml, 0,749 mmol) è stato addizionato riscaldato a 45 °C. Dopo 2 ore, la miscela di reazione è stata spenta con acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (0,049 g, 20%). PF: 139-142°C. Massa: 571,7 (M⁺). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,24 (s, 1H), 7,85 (dd, *J* = 8,2,3,1 Hz, 1H), 7,50-7,29 (m, 5H), 7,14 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,02 (m, 2H), 6,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,11 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,40 (s, 2H), 4,66 (quintetto, *J* = 6,1 Hz, 1H), 2,00 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,42 (d, *J* = 6,1 Hz, 6H). Eccesso enantiomerico: 89,8% come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak, arricchito con isomero a eluizione rapida (tempo di ritenzione = 10,64 min.).

Esempio B2

(R)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one

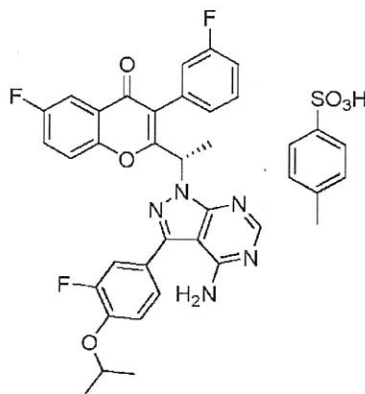
[0134] A una soluzione di intermedio 13 (0,284 g, 0,989 mmol) in THF (5,0 ml), sono stati addizionati intermedio 3 (0,250 g, 0,824 mmol) e tris(4-metossi)fenilfosfina (0,435 g, 1,23 mml) e agitati a TA per 5 minuti. Diisopropilazodicarbossilato (0,25 ml, 1,23 mmol) è stato addizionato (e) agitato a temperatura ambiente. Dopo 12 ore, la miscela di reazione è stata spenta con acqua ed estratta con etilacetato. Lo strato organico è stato essiccato su solfato di sodio e concentrato a pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

purificato mediante cromatografia su colonna con etilacetato:etere di petrolio a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (0,105 g, 22%). PF: 145-148°C. Massa: 571,7 (M⁺). ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,23 (s, 1H), 7,85 (dd, *J* = 8,1,3,0 Hz, 1H), 7,50-7,29 (m, 5H), 7,14 (t, *J* = 8,4 Hz, 1H), 7,02 (m, 2H), 6,92 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H), 6,10 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H), 5,42 (s, 2H), 4,64 (quintetto, *J* = 6,1 Hz, 1H), 1,99 (d, *J* = 7,2 Hz, 3H), 1,42 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H). Eccesso enantiomerico: 95,4% come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak, arricchito con isomero a eluizione tardiva (tempo di ritenzione = 14,83 min.).

Sale 4-metilbenzensolfonato del Composto B1

10 **(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one 4-metilbenzensolfonato**
[0135]



15 **[0136]** (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one 4-metilbenzensolfonato: a (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (22,7 g, 39,69 mmol) in isopropanolo (600 ml), è stato addizionato acido p-toluensolfonico (8,30 g, 43,66 mmol) e tenuto a riflusso per 1 ora. La miscela di reazione è stata concentrata, co-distillata con etere di petrolio ed essiccata. Al residuo, è stata addizionata acqua (300

20

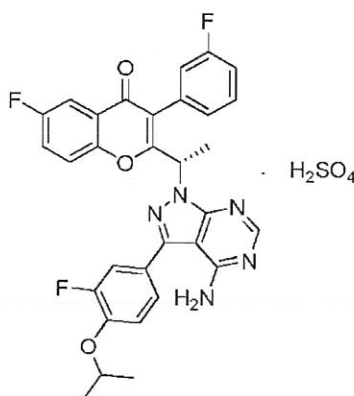
Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USPM-041R

ml) ed è stato agitato per 30 minuti. Il solido è stato filtrato, lavato con etere di petrolio ed essiccato sottovuoto a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (28,2 g, 95%). PF: 138-141°C. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,11 (s, 1H), 7,85 (dd, *J* = 8,0,3,0 Hz, 1H), 7,80 (d, *J* = 8,2 Hz, 2H), 7,51 (dd, *J* = 9,3,4,3 Hz, 1H), 7,45 (dd, *J* = 7,5,3,1 Hz, 1H), 7,42-7,31 (m, 3H), 7,29 (m, 2H), 7,22 (d, *J* = 8,0 Hz, 2H), 7,16 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,08 (dt, *J* = 8,5,2,5 Hz, 1H), 6,97 (br s, 1H), 6,88 (br s, 1H), 6,11 (q, *J* = 7,2 Hz, 1H), 4,67 (quintetto, *J* = 6,0 Hz, 1H), 2,36 (s, 3H), 2,03 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,43 (d, *J* = 6,0 Hz, 6H). Massa: 572.4 (M⁺ + 1-PTSA). Eccesso enantiomerico: 93,4% come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak, arricchito con isomero a eluizione rapida (tempo di ritenzione = 12,35 min.).

Sale solfato del Composto B1

(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one solfato

[0137]



15

[0138] (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one solfato: a (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one (15,0 g, 26,24 mmol) in isopropanolo (600 ml), è stato raffreddato a 0 °C. A questo, è stato addizionato acido solforico (2,83 g, 28,86

20

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

mmol) e agitato a temperatura ambiente per 24 ore. La massa di reazione è stata filtrata con etere di petrolio ed essiccata sottovuoto. Al solido, è stata addizionata acqua (150 ml) ed è stato agitato per 30 minuti. Il solido è stato filtrato, lavato con etere di petrolio ed essiccato sottovuoto a dare il composto del titolo come un solido bianco sporco (13,5 g, 76%). PF: 125-127 °C. ¹H-NMR (δ ppm, CDCl₃, 400 MHz): 8,11 (s, 1H), 7,85 (dd, *J* = 8,0,3,0 Hz, 1H), 7,51 (dd, *J* = 9,2,4,2 Hz, 1H), 7,45-7,31 (m, 3H), 7,29 (m, 1H), 7,15 (t, *J* = 8,3 Hz, 1H), 7,08 (dt, *J* = 8,5,2,4 Hz, 1H), 6,96 (br s, 1H), 6,88 (br s, 1H), 6,09 (q, *J* = 7,1 Hz, 1H), 4,676 (quintetto, *J* = 6,1 Hz, 1H), 2,01 (d, *J* = 7,1 Hz, 3H), 1,42 (d, *J* = 6,1 Hz, 6H). Massa: 572,2 (M⁺ + 1-H₂SO₄). Eccesso enantiomerico: 89,6% come determinato mediante HPLC su una colonna AD-H chiralpak, arricchito con isomero a eluizione rapida (tempo di ritenzione = 12,08 min.).


[0139] Vari altri sali di addizione acida del composto B1 sono stati preparati come fornito nella Tabella 1.

Tabella 1

Acido	Metodo di preparazione	Punto di fusione (°C)
Acido cloridrico	Composto B1 (1 eq.) disciolto in THF, è stato addizionato HCl/Et ₂ O in eccesso, la soluzione trasparente ottenuta è stata fatta evaporare completamente. Il residuo ottenuto è stato lavato con acqua.	130-132
Acido p-toluensolfonico	Composto B1 (1 eq.) disciolto in alcol isopropilico (IPA), tenuto a riflusso per 30 minuti, l'acido (1,1	138-141 °C.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Acido	Metodo di preparazione	Punto di fusione (°C)
	eq.) in IPA è stato addizionato, la soluzione trasparente ottenuta è stata fatta evaporare completamente. Il residuo ottenuto è stato lavato con acqua.	
Acido benzensolfonico	Composto B1 (1 eq.) disciolto in IPA, tenuto a riflusso per 30 minuti, l'acido (1,1 eq.) in IPA è stato addizionato, la soluzione trasparente non ottenuta, il residuo ottenuto è stato fatto evaporare completamente ed è stato lavato con acqua.	170-172
Acido maleico	Composto B1 (1 eq.) disciolto in IPA, tenuto a riflusso per 30 minuti, l'acido (1,1 eq.) in IPA è stato addizionato, la soluzione trasparente non ottenuta, il residuo ottenuto è stato fatto evaporare completamente ed è stato lavato con acqua.	107-109
acido solfonico di canfora	Composto B1 (1 eq.) disciolto in IPA, tenuto a riflusso per 30 minuti, l'acido (1,1 eq.) in IPA è stato addizionato, la soluzione trasparente non ottenuta, il residuo ottenuto è stato fatto evaporare completamente ed è stato lavato con acqua.	120-121
Acido solforico	Composto B1 (1 eq.) disciolto in IPA, tenuto a riflusso per 30 minuti, l'acido (1,1 eq.) in IPA è stato	125-127


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Acido	Metodo di preparazione	Punto di fusione (°C)
	addizionato, la soluzione trasparente ottenuta è stata fatta evaporare completamente. Il residuo ottenuto è stato lavato con acqua.	

STABILITÀ METABOLICA

[0140] Gli studi sulla stabilità metabolica sono stati condotti utilizzando microsomi epatici di topo, ratto ed essere umano. Il protocollo per gli studi con i microsomi epatici di topo, ratto ed essere umano (tutti da BD Gentest, USA) viene fornito di seguito. In
5 breve, 0,4 mg di proteina sono stati preincubati con 2 mM di NADPH (cofattore) in tampone fosfato (pH~7,4) per 15 minuti a 37 °C e poi addizionati con 1 µM di articolo sperimentale e incubati ulteriormente per 60 minuti in triplicato. La miscela di reazione è stata terminata con metanolo contenente uno standard interno e centrifugata ulteriormente per analizzare l'articolo sperimentale restante nel surnatante mediante LC-
10 MS/MS. Il composto progenitore percentuale restante è stato calcolato rispetto a campioni simili terminati a 0 minuti. I risultati sono forniti nelle tabelle di seguito.

[0141] I dati sottostanti, sorprendentemente mostrano che il composto A1 della presente invenzione ha una stabilità metabolica sensibilmente maggiore nei microsomi epatici umani rispetto al suo enantiomero A2 e composto racemico A. Ad esempio, il composto
15 dell'Esempio A1 ha una stabilità metabolica maggiore di quasi 5 volte nei microsomi epatici umani rispetto a quello dell'Esempio A2. Grazie alla loro potenziata stabilità metabolica, i composti attualmente rivendicati hanno un profilo farmacocinetico migliore.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Dati comparativi per il Composto A e i suoi singoli isomeri A1 e A2			
Esempio	Stabilità metabolica in microsomi epatici		
	Topo	Ratto	Essere umano
A	32,6	43,1	38,4
A1	46,1	35,8	54,5
A2	34,7	44,2	11,4

[0142] Analogamente, i dati sottostanti, sorprendentemente mostrano che il composto B1 della presente invenzione ha una stabilità metabolica sensibilmente maggiore nei microsomi epatici umani rispetto al suo enantiomero B2 e composto racemico B. Ad esempio, il composto dell'Esempio B1 ha una stabilità metabolica maggiore di quasi 3 volte nei microsomi epatici umani rispetto a quello dell'Esempio B2. Grazie alla loro potenziata stabilità metabolica, i composti attualmente rivendicati hanno un profilo farmacocinetico migliore.

Dati comparativi per il Composto B e i suoi singoli isomeri B1 e B2			
Esempio	Stabilità metabolica in microsomi epatici		
	Topo	Ratto	Essere umano
B	54,9	51,4	46,9
B1	36,6	23,1	74,9
B2	54,1	48,6	27,5

FARMACOCINETICA

[0143] La biodisponibilità orale del composto B1 (base libera) e del suo sale PTSA è stata valutata nei ratti. Il protocollo per gli studi di farmacocinetica nel ratto viene

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

fornito di seguito.

[0144] Tutti gli animali sono stati tenuti a digiuno durante la notte (12 ore) prima del dosaggio e hanno continuato fino a 4 ore dopo la somministrazione dell'articolo sperimentale. Le formulazioni dell'articolo sperimentale sono state preparate in 1% di Tween 80 e 99% di terreni (metilcellulosa allo 0,5%, 4000 cPs, pH 2.2). I campioni di sangue (150 µl da ciascun animale) sono stati raccolti dal seno orbitale e posti in una provetta da microcentrifuga contenente disodio EDTA come anticoagulante. I campioni di sangue sono stati immediatamente centrifugati con una velocità di 1000 giri per 10 minuti a 4 °C e i campioni di plasma separati sono stati congelati a una temperatura inferiore a -80 °C e stoccati fino all'analisi. Le concentrazioni dell'articolo sperimentale in tutte le formulazioni sono state analizzate mediante HPLC. Le concentrazioni plasmatiche dell'articolo sperimentale in tutti i campioni sono state analizzate mediante LC-MS/MS. I parametri farmacocinetici, cioè C_{max} , AUC_{0-t} , T_{max} e $t_{1/2}$, sono stati stimati utilizzando il software WinNonlin.

[0145] Il sale PTSA del composto dell'Esempio B1 ha mostrato una C_{max} quasi doppia e un'area sotto la curva (AUC) quasi tripla rispetto a quella del composto di base libera B1.

[0146] Analogamente, la biodisponibilità orale del composto B1 (base libera) e del suo sale PTSA è stata valutata nei cani. Il sale PTSA del composto B1 ha mostrato una C_{max} più che doppia e un'area sotto la curva (AUC) quasi quadrupla rispetto a quella del composto di base libera B1.

SAGGIO BIOLOGICO

Saggio 1: determinazione fluorescente dell'attività enzimatica di PI3K

[0147] Il saggio omogeneo di fluorescenza a tempo risolto (HTRF) consentire di rilevare il 3,4,5-trifosfato (PIP3) formato come risultato della fosforilazione di


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.L. n° USBM-041R

fosfotidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP2) da isoforme di PI3K come α , β , γ o δ .

[0148] L'attività dell'isoforma PI3K per α , β , γ o δ è stata determinata utilizzando un kit per saggio HTRF™ di PI3K umana (Millipore, Billerica, MA) con modificazioni. Tutte le incubazioni sono state eseguite a temperatura ambiente. In breve, 0,5 μ l di 40X inibitore (in DMSO al 100%) o DMSO al 100% sono stati addizionati a ciascun pozzetto di una piastra nera a 384 pozzetti (Greiner Bio-One, Monroe, NC) contenente 14,5 μ l di miscela di tampone di reazione 1X / PIP2 (10 mM di MgCl₂, 5 mM di DTT, 1,38 μ M di PIP2) con o senza enzima e incubati per 10 minuti. Dopo l'incubazione iniziale, 5 μ l/pozzetto di 400 μ M di ATP sono stati addizionati e incubati per altri 30 minuti. La reazione è stata terminata addizionando 5 μ l/pozzetto di soluzione di arresto (Millipore, Billerica, MA). Cinque microlitri di miscela di rilevamento (Millipore, Billerica, MA) sono stati poi addizionati a ciascun pozzetto ed è stato incubato per 6-18 ore al buio. Il rapporto della HRTF è stato misurato su un lettore per micropiastre (BMG Labtech., Germania) a una lunghezza d'onda d'eccitazione di 337 nm e lunghezze d'onda di emissione di 665 e 620 nm con un tempo di integrazione di 400 μ sec.

[0149] I risultati sono mostrati di seguito.

[0150] Dati comparativi per il Composto A e i suoi singoli isomeri A1 e A2

Esempio	IC ₅₀ di Pi3K delta (nM)	% di inibizione a 1 μ M		
		Pi3K α	Pi3K β	Pi3K γ
A	37,32	2,63	9,95	55,85
A1	13,83	8,91	47,87	80,60
A2	>10 μ M	0,95	38,74	66,3

Profilo di selettività del Composto A1

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Saggio	IC ₅₀ (nM)	Selettività in numero di volte		
		PI3K δ	PI3K α	PI3K β
Enzima	13,83	>1000	>54	>9

[0151] Dati comparativi per il Composto B e i suoi singoli isomeri B1 e B2

Esempio	IC ₅₀ di Pi3K δ (nM)	% di inibizione a 1 μ M		
		Pi3K α	Pi3K β	Pi3K γ
B	24,89	37,90	18	18,3
B1	22,33	19,13	44,88	47,21
B2	1447	25,29	52,01	68,10
Profilo di selettività del Composto B1				
Saggio	IC ₅₀ (nM)	Selettività in numero di volte		
		PI3K δ	PI3K α	PI3K β
Enzima	22,23	>10000	>50	>48

Saggio 2: saggio di proliferazione cellulare *in vitro* in linee cellulari leucemiche

[0152] I saggi di inibizione della crescita sono stati eseguiti utilizzando terreni integrati con FBS al 10%. Le cellule sono state seminate a una concentrazione di 5.000-20.000 cellule/pozzetto in una piastra a 96 pozzetti. Il composto sperimentale a un intervallo di concentrazione compreso tra 0,01 e 10.000 nM è stato addizionato dopo 24 ore. La crescita è stata valutata utilizzando il test di riduzione del colorante bromuro di 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT) a 0 ore (prima dell'addizione del composto sperimentale) e 48 ore dopo l'addizione del composto sperimentale.

L'assorbanza è stata letta su un Fluostar Optima (BMG Labtech, Germania) a una

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n. USBM-041R

lunghezza d'onda di 450 nm. I dati sono stati analizzati utilizzando GraphPad Prism e l'inibizione percentuale dovuta al composto sperimentale confrontato con il controllo è stata calcolata di conseguenza.

[0153] Risultati: sebbene sia stata osservata una leggera riduzione dipendente dalla dose della vitalità cellulare, i composti non hanno mostrato alcuna citotossicità apparente durante il periodo di incubazione di 72 ore.

Saggio 3: inibizione della fosforilazione di AKT in linee cellulari leucemiche:

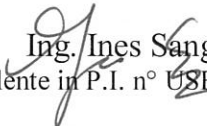
[0154] Inibizione della fosforilazione di AKT in linee cellulari leucemiche: le cellule THP-1, HL-60, MOLT-4, RPMI-8226 o DLBCL sono state incubate con concentrazioni desiderate di composto per 48 ore. Le cellule sono state lisate e pAKT è stata determinata mediante Western Blotting. Le bande sono state quantificate utilizzando ImageJ e normalizzate rispetto all'actina.

[0155] Risultati: il Composto A1 e Composto B1 quando testati a 1 μ M hanno mostrato inibizione dal 50 al 90%.

Saggio 4: inibizione di segnalazione di PI3K δ in basofili per sangue intero umano

[0156] La segnalazione di PI3K δ nei basofili manifestata da un'alterazione dell'espressione di CD63 indotta da anti-Fc ϵ R1 è un utile marcatore farmacodinamico determinato utilizzando il kit Flow2CAST® (Buhlmann Laboratories, Svizzera). In breve, prevede le seguenti fasi:

- Miscelare il campione di sangue anti-coagulato invertendo varie volte la provetta del prelievo venoso
- Preparare provette in polipropilene o polistirene da 3,5 ml prive di pirogeno e fresche adatte per le misurazioni con citofluorimetria
- Aggiungere 49 μ l di sangue intero del paziente a ciascuna provetta.
- Aggiungere 1 μ l di DMSO al 10% (sfondo) o composto (DMSO al 10%) alle


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

- provette assegnate e miscelare delicatamente. Incubare a temperatura ambiente per 15 minuti
- Pippettare 50 µl del tampone di stimolazione (sfondo) o Ab anti-FcεRI a ciascuna provetta
- 5
- Aggiungere 100 µl di tampone di stimolazione a ciascuna provetta
 - Miscelare delicatamente. Aggiungere 20 µl di reagente di colorazione (miscela 1:1 di FITC-CD63 e PE-CCR3) a ciascuna provetta
 - Miscelare delicatamente, coprire le provette e incubare per 15 minuti a 37 °C a bagnomaria (utilizzando un incubatore ci vorrà un tempo di incubazione più
- 10
- lungo di circa 10 minuti a causa del trasferimento del calore meno efficiente).
 - Aggiungere 2 ml di reagente di lisi pre-riscaldato (18-28 °C) a ciascuna provetta, miscelare delicatamente
 - Incubare per 5-10 minuti a 18-28 °C
 - Centrifugare le provette per 5 minuti a 500 x g
- 15
- Far decantare il surnatante utilizzando carta assorbente
 - Risospendere il pellet cellulare con 300-800 µl di tampone di lavaggio
 - Sottoporre a vortice e acquisire i dati sulla citofluorimetria entro lo stesso giorno.
 - Le cellule positive a CD63 percentuali all'interno della popolazione di basofili
- 20
- controllata devono essere determinate in diversi gruppi di trattamento e normalizzate rispetto al controllo del veicolo.

[0157] Risultati: il Composto A1 e il Composto B1 hanno inibito l'espressione di CD63 mediata da anti-FcεRI in basofili di sangue intero umano con $EC_{50} \leq 100$ nM rispettivamente.

25 **Saggio 4a: specificità del composto basata su cellule verso l'inibizione di isoforme**


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

δ , α , β o γ di PI3K

[0158] La specificità del composto verso PI3K δ è stata determinata in un saggio di proliferazione cellule B indotta da IgM. Le cellule B isolate dal sangue di soggetti sani sono state seminate in piastre per coltura tissutale da 96 pozzetti e incubate con concentrazioni desiderate di composto per 30 minuti. Le cellule sono state stimolate con 5 μ g/ml di IgM anti-umane di capra purificate. La crescita è stata saggiata utilizzando il test di riduzione del colorante bromuro di 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT). Per la selettività contro le isoforme α , β o γ di PI3K, sono stati seminati macrofagi RAW o NIH-3T3 in una piastra per coltura tissutale da 6 pozzetti e incubati per una notte. Il terreno completo è stato sostituito con terreni privi di siero il giorno successivo e il composto alle concentrazioni desiderate è stato addizionato. Dopo 15 minuti, sono stati addizionati 20 ng/ml di PDGF, 5 μ M di LPA o 50 ng/ml di c5a e sono stati incubati per altri 10 minuti. Le cellule sono state lisate e la fosforilazione di AKT è stata determinata mediante Western Blotting. L'intensità delle bande è stata determinata utilizzando ImageJ 1.42q (NIH, USA) e normalizzata rispetto all'actina (controllo di caricamento).

Profilo di selettività del Composto A1				
Saggio	EC ₅₀ (nM)	Selettività in numero di volte		
	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ
Basato su cellule	<50 nM	>1000	>30	>8
Profilo di selettività del Composto B1				
Saggio	EC ₅₀ (nM)	Selettività in numero di volte		
	PI3K δ	PI3K α	PI3K β	PI3K γ

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Profilo di selettività del Composto A1				
Saggio	EC ₅₀ (nM)	Selettività in numero di volte		
		PI3K δ	PI3K α	PI3K β
Basato su cellule	<30 nM	>10000	>34	>17

Saggio 5: Inibizione dell'apoptosi in linee cellulari leucemiche

[0159] L'apoptosi nelle cellule leucemiche è stata determinata utilizzando il kit Caspase 3 *in situ* (Millipore, US) come esposto di seguito:

- 5 • Seminare le cellule leucemiche a una densità di 1×10^6 cellule/pozzetto in una piastra a 6 pozzetti
- Aggiungere il composto sperimentale/DMSO alle concentrazioni desiderate
- Incubare la piastra per 24 ore a 37 °C in incubatore con CO₂ 5%
- Raccogliere le cellule in una provetta da centrifuga da 2 ml
- Aggiungere 1,6 μ L di reagente FLICA 5X preparata fresca e miscelare le cellule
10 colpendo leggermente le provette
- Incubare le provette per 1 ore a 37 °C in CO₂ al 5%
- Aggiungere 2 ml di tampone di lavaggio 1X a ciascuna provetta e miscelare
- Centrifugare le cellule a <400 x g per 5 minuti a temperatura ambiente.
- Rimuovere con attenzione e scartare il surnatante e sottoporre delicatamente a
15 vortice il pellet cellulare per rompere eventuali raggruppamenti di cellule.
- Rispondere il pellet cellulare in 300 μ l di tampone di lavaggio 1X
- Posizionare 100 μ L di ciascuna sospensione cellulare in ciascuno dei due pozzetti di una piastra nera per microtitolazione. Evitare la formazione di bolle.
- Leggere l'assorbanza di ciascun micropozzetto utilizzando una lunghezza d'onda
20 di eccitazione di 490 nm e una lunghezza d'onda di emissione di 520 nm

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

- Deve essere calcolato l'aumento percentuale dell'attività della caspasi-3 manifestato da un aumento di fluorescenza rispetto al bianco di controllo.

[0160] Risultati: Il Composto A1 e il Composto B1 in modo dipendente dalla dose hanno indotto l'attività della Caspasi-3 nelle linee cellulari testate.

5 **Saggio 6: screening dell'attività antitumorale in cellule leucemiche primarie umane**

[0161]

6-I: analisi citofluorimetrica dell'induzione apoptotica in cellule leucemiche di midollo osseo di pazienti affetti da AML in seguito a trattamento con composto utilizzando colorazione con Annessina V e 7-AAD: cellule mononucleate sono state estratte mediante il metodo Ficoll e seminate in piastre. Le cellule sono state trattate con composti differenti per 48 ore prima che fossero analizzate mediante citofluorimetria. Dopo lavaggio con PBS, 1×10^5 cellule sono state colorate con Annessina V-APC e 7-AAD. La colorazione positiva all'Annessina V misura le cellule apoptotiche totali, incluse le cellule apoptotiche precoci e tardive. Per le cellule positive all'Annessina V, il segnale negativo di 7-AAD riflette le cellule apoptotiche precoci.

6-II: analisi della pAKT di campione di midollo osseo di pazienti affetti da AML utilizzando il kit ELISA per pAKT: cellule mononucleate sono state estratte mediante il metodo Ficoll e seminate in piastre. Le cellule sono state trattate con composti differenti per 48 ore prima che fossero analizzate con kit ELISA per pAKT seguendo il protocollo del prodotto. In breve, 1×10^6 cellule sono state trasferite in un pozzetto per kit ELISA e lisate con 10 μ L di $5 \times$ di miscela di lisi cellulare [fosfo-AKT 1/2/3 (Ser473) InstantOne™ ELISA Kit, eBioscience, 85-86042]. Le cellule sono state incubate successivamente con 50 μ l di miscela di anticorpi per 1 ora a temperatura ambiente su un vibratore di micropiastre (-300

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM 041R

giri/min). Dopo incubazione con reagente di rilevamento, il risultato è stato misurato utilizzando uno spettrofotometro per micropiastre SpectraMAX Plus impostato a 450 nm.

5 6-III: analisi di proliferazione cellulare di campione di midollo osseo di pazienti affetti da AML utilizzando il saggio MTS: cellule mononucleate sono state estratte mediante il metodo Ficoll e seminate in piastre. Le cellule sono state trattate con composti differenti per 48 ore e 72 ore prima che fossero analizzate con saggio MTS seguendo le istruzioni del prodotto. In breve, 20 μ L della
10 soluzione MTS sono stati addizionati a ciascun pozzetto contenente la sospensione cellulare da 100 μ L, seguiti da incubazione per 4 ore a 37 °C, al 95% di umidità con presenza di CO₂ al 5%. L'assorbanza di 490 nm (A490) è stata letta utilizzando lo spettrofotometro per micropiastre SpectraMAX Plus.

[0162] Risultati: il trattamento con il composto A1 e il composto B1 ha provocato una riduzione dipendente dalla dose della proliferazione e della fosforilazione di AKT con
15 un aumento concomitante del numero di cellule apoptotiche.

Composto	Risultati
A1	>50% di inibizione di PAKT a 0,3 μ M;
	aumento di ~1,5 volte dell'apoptosi a 3 μ M e
	riduzione della vitalità cellulare dipendente dalla dose.
B1	>50% di inibizione di PAKT a 0,3 μ M;
	aumento di ~1,5 volte dell'apoptosi a 3 μ M e
	riduzione della vitalità cellulare dipendente dalla dose.

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Saggio 6a: screening dell'attività antitumorale in cellule di mieloma multiplo

[0163] I campioni sono stati prelevati da due pazienti cui era stato da poco diagnosticata la malattia limitata alla catena Kappa di IgG di Stadio II e Lambda di IgG di stadio III. Questo screening è stato eseguito inducendo apoptosi utilizzando dosi e tempi determinati dal saggio MTT. 1-5 x 10⁵ cellule sono state raccolte mediante centrifugazione. Le cellule sono state risospese in 500 µl di 1X tampone legante. 5 µl di Annessina V-FITC e 5 µl di ioduro propidio sono stati addizionati. Le cellule sono state incubate a temperatura ambiente per 5 minuti al buio.

[0164] Quantificazione mediante citofluorimetria: il legame dell'Annessina V-FITC è stato analizzato mediante citofluorimetria (Es = 488 nm; Em = 530 nm) utilizzando il rilevatore del segnale di FITC (solitamente FL1) e colorazione con PI utilizzando un rilevatore del segnale di emissione della ficoeritrina (solitamente FL2). I risultati sono mostrati di seguito e nella Figura 1.

B1	>75% di inibizione di PAKT a 3,0 µM; aumento di ~1,5 volte dell'apoptosi a 3 µM e
	riduzione della vitalità cellulare dipendente dalla dose.

Saggio 7: screening dell'attività antitumorale in varie linee cellulari leucemiche

[0165] La proliferazione di cellule leucemiche immortalizzate rappresentative di varie indicazioni è stata determinata mediante un saggio MTT [bromuro di 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio]. Le cellule sono state incubate con Composto B1 per differenti periodo di tempo (72-96 ore) in base al loro tempo di raddoppiamento.

Linea cellulare	Patologia	Tipo di cellula	Organo
TOLEDO	Linfoma diffuso a grandi	Linfocita B	Sangue

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Linea cellulare	Patologia	Tipo di cellula	Organo
	cellule/Linfoma a cellule B non Hodgkin		periferico
U266B1	Mieloma, Plasmocitoma (CD40-)	Linfocita B	Sangue periferico
MOLT-4	ALL	Linfoblasto T	Sangue periferico
Jurkat	Leucemia a cellule T acuta	Linfocita T	Sangue periferico
THP-1	Leucemia monocitica acuta	Monocita	Sangue periferico
MM-1R	Mieloma con immunoglobulina A lambda	Linfoblasto B	Sangue periferico
DLBCL	Linfoma a cellule grandi	Linfoblasto B	Fluido da ascite
MM-1S	Mieloma con immunoglobulina A lambda	Linfoblasto B	Sangue periferico
U937	Linfoma istiocitico	Monocita	Effusione pleurica
Raji	Linfoma di Burkitt	Linfoblasto B	Mascella
CCRF-CEM	ALL	Linfoblasto T	Sangue periferico


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Linea cellulare	Patologia	Tipo di cellula	Organo
HL-60	AML	Promieloblasto	Sangue periferico

[0166] Risultati: complessivamente, è stata ottenuta una inibizione della crescita del 50% per la maggior parte delle linee cellulari B, T e monocitica a una concentrazione compresa tra 0,5-7,5 μ M di Composto B1. I dati hanno dimostrato la capacità del Composto B1 di inibire la proliferazione delle cellule leucemiche sebbene con efficacia
5 differente in base al tipo di cellula.

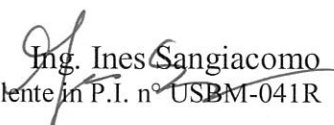
Saggio 8: screening dell'attività antitumorale in cellule di CLL umano

[0167] Cellule primarie di CLL sono state incubate con diluizioni seriali di composto sperimentale (Composto B1) per 48 ore e testate per l'apoptosi mediante colorazione di caspasi-3 e 7AAD attivata misurata mediante citofluorimetria. Dopo 72 ore di
10 incubazione, le cellule di CLL sono state valutate per la citotossicità utilizzando il reagente colorimetrico MTS. Akt fosforilata (S473) è stata misurata mediante citofluorimetria dopo un'ora d'incubazione del composto sperimentale e dieci minuti di incubazione con anti-IgM o anti-IgD. La fosforilazione di Akt è stata quantificata mediante intensità di fluorescenza media (MFI). Dei sette campioni da pazienti affetti
15 da CLL utilizzati per gli esperimenti, cinque avevano IGHV mutata, cinque avevano delezione in 13q o citogenetica normale determinata mediante ibridazione fluorescente *in situ*, tre erano negativi per ZAP-70 e sette erano negativi per CD38. L'espressione di IgM variava tra il 13% e il 90%, laddove l'espressione di IgD era uniformemente elevata. Il composto sperimentale ha indotto significativamente l'apoptosi (caspasi-
20 3+/7AAD+) e la citotossicità in modo dipendente dalla dose in concentrazioni comprese tra 0,1 e 25,6 μ M. L'incubazione con immunoglobulina anti-superficie ha


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

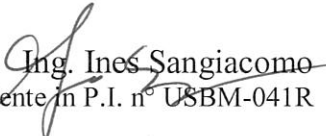
significativamente indotto la fosforilazione di Akt rispetto ai soli terreni, mentre l'aggiunta del composto sperimentale ha significativamente abrogato questo effetto e riportato la fosforilazione di Akt alla linea basale.

[0168] Risultati: il composto sperimentale induce citotossicità e apoptosi in cellule di
5 CLL, mediante l'inibizione di pAKT. I risultati sono mostrati anche nelle Figure 2A, 2B
e 2C.


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Rivendicazioni

1. Composto scelto tra 2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one e suoi sali farmaceuticamente accettabili.
2. Composto scelto tra (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one e suoi sali farmaceuticamente accettabili.
3. Il composto della rivendicazione 2, in cui il composto è privo di (R)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one e suoi sali farmaceuticamente accettabili.
4. Il composto della rivendicazione 2, in cui il composto è (S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one 4-metilbenzensolfonato.
5. Il composto della rivendicazione 2, in cui il composto è scelto tra
(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one solfato;
(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one cloridrato;
(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one benzensolfonato;
(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one maleato; e
(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isoprossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-6-fluoro-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one canfora


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

solfonato.

6. Composto scelto tra

(S)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one,

e suoi sali farmaceuticamente accettabili.

7. Il composto della rivendicazione 6, in cui il composto è privo di (R)-2-(1-(4-ammino-3-(3-fluoro-4-isopropossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)etil)-3-(3-fluorofenil)-4H-cromen-4-one e suoi sali farmaceuticamente accettabili.

8. Composizione farmaceutica comprendente un composto di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7 e almeno un veicolo farmaceuticamente accettabile.

9. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7 per l'uso in un metodo di inibizione di un'attività catalitica di una chinasi PI3 δ presente in una cellula, in cui l'inibizione ha luogo in un soggetto affetto da una patologia o un disturbo che è cancro, un disturbo osseo, una malattia infiammatoria, una malattia immunitaria, una malattia del sistema nervoso, una malattia metabolica, una malattia respiratoria, trombosi o una cardiopatia.

10. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7 per l'uso nel trattamento di una patologia o un disturbo associata/o a PI3K in un soggetto che ne abbia bisogno, in cui la patologia, il disturbo o l'affezione associata/o a PI3K è una patologia correlata al sistema immunitario, una patologia o un disturbo che implica infiammazione, cancro o altra patologia proliferativa, una patologia o un disturbo epatico, o una patologia o un disturbo renale.

11. Il composto per l'uso secondo la rivendicazione 10, in cui la patologia, il disturbo o l'affezione associata/o a PI3K è scelta/o tra infiammazione, glomerulonefrite, uveite, patologie o disturbi epatiche/i, patologie o disturbi renali, broncopneumopatia cronica


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

ostruttiva, artrite reumatoide, malattie infiammatorie croniche intestinali, vasculite, dermatite, osteoartrite, miopatie infiammatorie, rinite allergica, vaginite, cistite interstiziale, sclerodermia, osteoporosi, eczema, trapianto allogenico o xenogenico, rigetto dell'innesto, malattia del trapianto contro l'ospite (GVHD), lupus eritematoso, fibrosi polmonare, dermatomiosite, tiroidite, miastenia gravis, anemia emolitica autoimmune, fibrosi cistica, epatite cronica recidivante, cirrosi biliare primitiva, congiuntivite allergica, epatite, dermatite atopica, asma, sindrome di Sjogren, rigetto del trapianto di organo, sclerosi multipla, Guillain-Barre, uveite autoimmune, anemia emolitica autoimmune, anemia perniziosa, trombocitopenia autoimmune, arterite temporale, sindrome da antifosfolipidi, vasculiti come granulomatosi di Wegener, malattia di Behcet, psoriasi, dermatite erpetiforme, pemfigo volgare, vitiligine, morbo di Crohn, colite, colite ulcerosa, cirrosi biliare primitiva, epatite autoimmune, diabete mellito immuno-mediato o di tipo 1, malattia di Grave. Tiroidite di Hashimoto, ooforite e orchite autoimmune, disturbo autoimmune della ghiandola surrenale, lupus eritematoso sistemico, polimiosite, dermatomiosite, spondilite anchilosante, rigetto di trapianto, rigetto di innesto cutaneo, artrite, osteopatia associata a riassorbimento osseo aumentato, ileite, sindrome di Barrett, sindrome da distress respiratorio nell'adulto, patologia cronica ostruttiva delle vie aeree; distrofia corneale, tracoma, oncocerchiasi, oftalmia simpatica, endoftalmia; gengivite, periodontite; tubercolosi; lebbra; complicanze uremiche, nefrosi, sclerodermatite, psoriasi, patologie demielinizzanti croniche del sistema nervoso, neurodegenerazione correlata ad AIDS, morbo di Alzheimer, meningite infettiva, encefalomyelite, morbo di Parkinson, malattia di Huntington, sclerosi laterale amiotrofica, encefalite virale o autoimmune; disturbi autoimmuni, vasculite da immunocomplessi, lupus sistemico ed eritematoide; lupus eritematoso sistemico (LES); cardiomiopatia, cardiopatia ischemica, ipercolesterolemia,


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

aterosclerosi, preeclampsia; insufficienza epatica cronica, trauma cerebrale e della colonna vertebrale, cancro, tumori ematopoietici di linea linfoide, leucemia, leucemia linfocitica acuta, leucemia linfoblastica acuta, linfoma a cellule B, linfoma a cellule T, linfoma di Hodgkin, linfoma non-Hodgkin, linfoma a cellule capellute e linfoma di Burkett; tumori ematopoietici di linea mieloide, leucemie mielogene acute, leucemie mielogene croniche, sindrome mielodisplastica, leucemia promielocitica; carcinoma della vescica, carcinoma della mammella, carcinoma del colon, carcinoma del rene, carcinoma del fegato, carcinoma del polmone, cancro polmonare a piccole cellule, cancro esofageo, cancro della cistifellea, cancro ovarico, cancro pancreatico, cancro dello stomaco, cancro della cervice, cancro tiroideo, cancro della prostata, cancro della pelle, carcinoma spinocellulare; tumori di origine mesenchimale, fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma; tumori del sistema nervoso centrale e periferico, astrocitoma, neuroblastoma, glioma, schwannoma; melanoma, seminoma, teratocarcinoma, osteosarcoma, xenoderma pigmentoso, cheratoacantoma, cancro follicolare della tiroide, sarcoma di Kaposi, bronchite cronica, leucemia linfocitica cronica, mieloma multipli inclusi mieloma multiplo tipo smoldering (quiescente), mieloma non secretorio, mieloma osteosclerotico, leucemia plasmacellulare, plasmocitoma solitario e plasmocitoma extramidollare, linfoma a piccoli linfociti (SLL), linfoma non-Hodgkin indolente (I-NHL), leucemia linfocitica acuta (ALL), linfoma a cellule mantellari (MCL), linfoma follicolare, macroglobulinemia di Waldstrom (WM), linfoma a cellule T, linfoma a cellule B e linfoma diffuso a cellule B grandi (DLBCL).

12. Il composto per l'uso secondo la rivendicazione 10, in cui la patologia, il disturbo o la condizione associata/o a PI3K è scelta/o tra leucemia linfocitica cronica (CLL), linfoma non-Hodgkin (NHL), leucemia mieloide acuta (AML), mieloma multiplo (MM), linfoma a piccoli linfociti (SLL), linfoma non-Hodgkin indolente (I-NHL),


Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

leucemia linfocitica acuta (ALL), linfoma a cellule mantellari (MCL), linfoma follicolare, macroglobulinemia di Waldestrom (WM), linfoma a cellule T, linfoma a cellule B e linfoma diffuso a cellule B grandi (DLBCL).

13. Il composto per l'uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9-12, comprendente inoltre almeno un altro agente antitumorale, agente antinfiammatorio, agente immunosoppressivo, steroide, agente antinfiammatorio non steroideo, antistaminico, analgesico o una loro miscela.


* * * * *

Seguono N. 2 tavole di disegno.

Si dichiara che la presente traduzione è conforme al testo originale in lingua inglese.

Brescia, 27 Novembre 2017

In Fede,


Ing. Ines SANGIACOMO
(Consulente in P.I. n° USBM-041R)

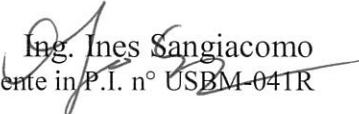

Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R

Figura 1

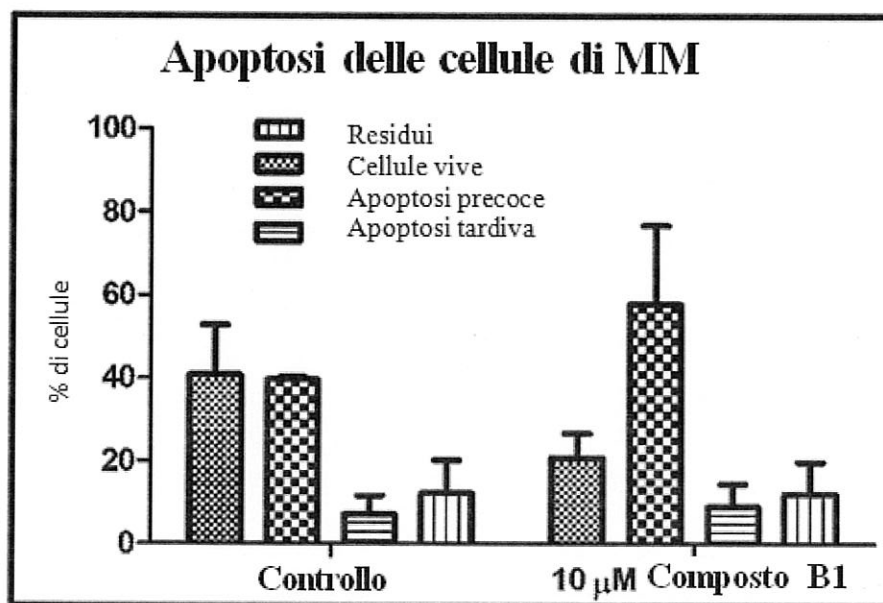
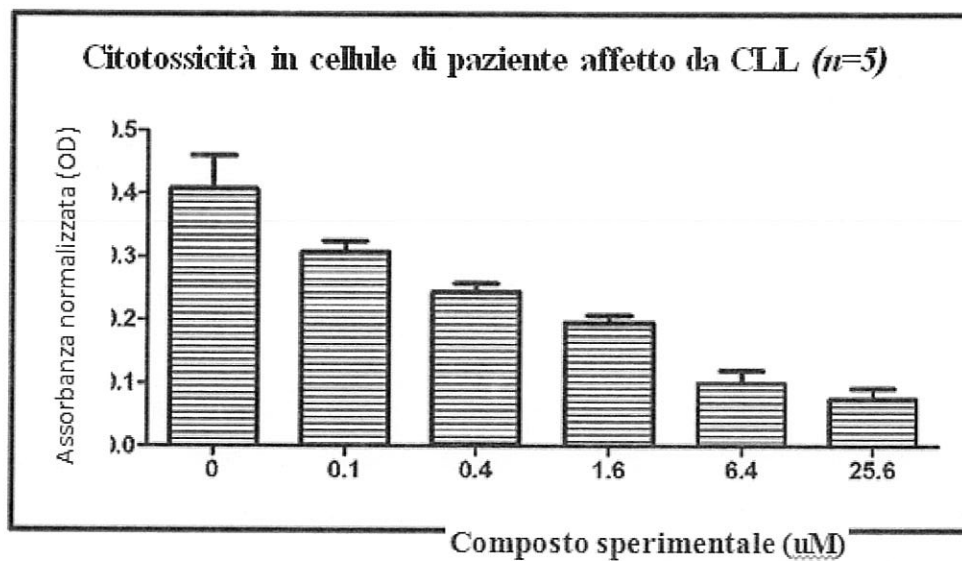


Figura 2A



Ing. Ines Sangiacomo
 Consulente in P.T. n° USBM-041R

Figura 2B

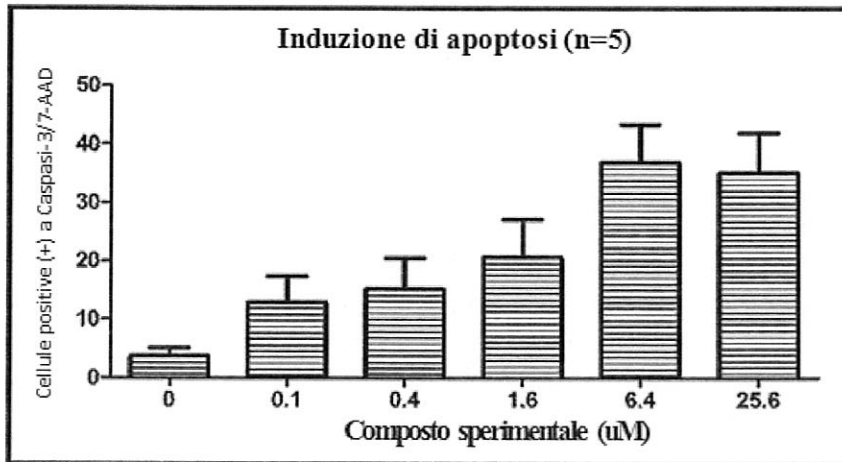
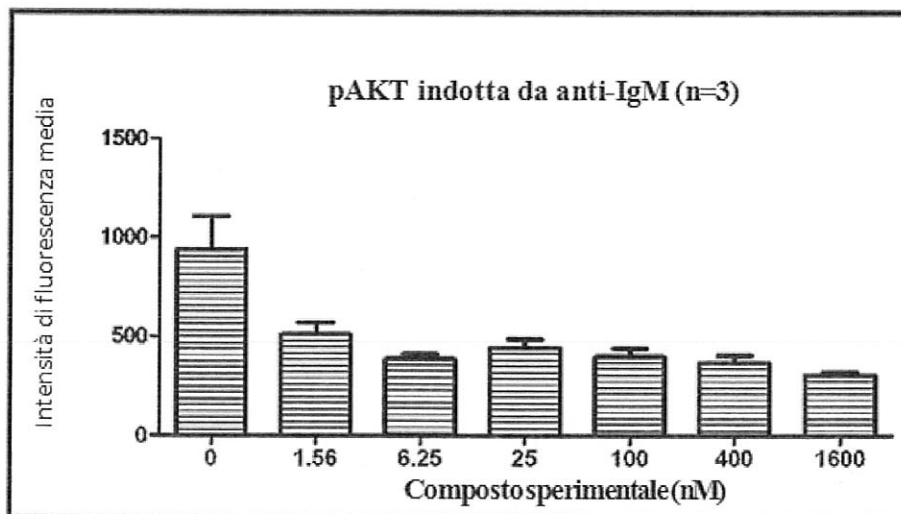


Figura 2C



Ing. Ines Sangiacomo
Consulente in P.I. n° USBM-041R