

SIB EX4278R

P072601SM:HRG/REC

Traduzione in lingua italiana del Brevetto Europeo

domanda n° 13731470.4, pubblicazione n° 2864328

a nome di The Institute of Cancer Research, Royal Cancer Hospital

di 123 Old Brompton Road, London, SW7 3RP, Regno Unito

“Composti farmaceuticamente attivi”

Jacopo de Benedetti
USBM-043R B

DESCRIZIONE

INTRODUZIONE

La presente invenzione riguarda composti farmaceuticamente attivi. Più specificamente, la presente invenzione riguarda composti che sono inibitori dell'attività enzimatica di Aurora chinasi. I composti dell'invenzione sono anche inibitori dell'attività della tirosina chinasi 3 (FLT3) FMS-simile. La presente invenzione si riferisce anche a processi per la preparazione di questi composti, a composizioni farmaceutiche che li comprendono e al loro utilizzo nel trattamento di disturbi proliferativi, come il cancro, così come altre malattie o condizioni in cui è implicata l'attività di Aurora chinasi e/o di FLT3.

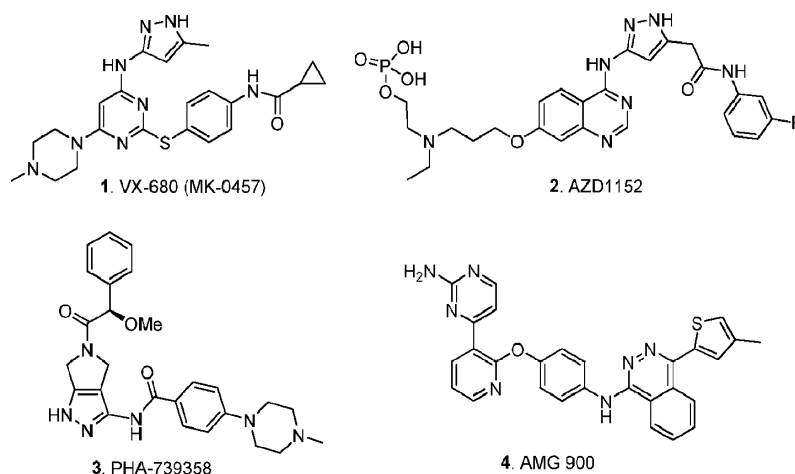
SFONDO DELL'INVENZIONE

Le malattie proliferative, come il cancro, sono caratterizzate da proliferazione cellulare incontrollata e non regolata. Ciò che induce precisamente una cellula a proliferare in modo incontrollato e non regolato è stato al centro di intense ricerche negli ultimi decenni.

Le Aurora chinasi, una famiglia di tre serina-treonina chinasi denominate A, B e C, giocano ruoli chiave e distinti in diversi stadi della mitosi.¹⁻³ Nelle prime fasi della mitosi, Aurora-A forma un complesso con la proteina di indirizzamento per Xklp2 (TPX2) che regola la maturazione del centrosoma e l'assemblaggio del fuso mitotico.^{4,5} Aurora-B forma complessi con la proteina centromerica interna (INCENP), survivina e borealina, regolando in tal modo la condensazione dei cromosomi, l'allineamento dei cromosomi, il checkpoint mitotico e la citochinesi.⁶⁻⁹ E' stata segnalata sovra-espressione di Aurora-A e Aurora-B in una vasta gamma di neoplasie umane, tra cui i carcinomi mammario, colon-rettale, ovarico, il glioma, il carcinoma tiroideo e il seminoma.¹⁰⁻¹⁶ La funzione di Aurora-C durante la mitosi è capita meno. Comunque, nel testicolo è stata riportata espressione

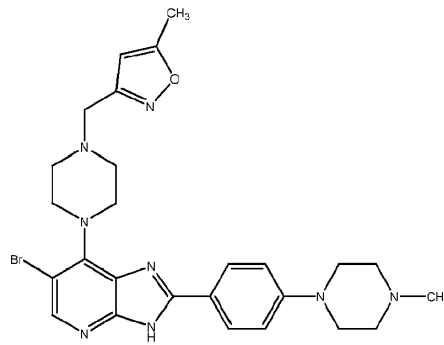
elevata di Aurora-C.^{17,18}

Negli ultimi anni, il bersagliamento delle Aurora chinasi con piccole molecole è diventato una strategia comune per la scoperta di nuovi chemioterapici per il cancro e sono stati riportati numerosi inibitori strutturalmente diversi dell'attività di Aurora,¹⁸⁻²⁰ tra cui **1** (VX-680 (MK-0457)),²¹ **2** (AZD1152)²², **3** (PHA-739358),^{23,24} e **4** (AMG 900)²⁵ (si veda sotto).



Tuttavia, rimane la necessità di identificare altri agenti terapeutici capaci di inibire l'attività di Aurora chinasi.

Le Pubblicazioni Internazionali dei Brevetti n. WO2007/072017 e WO2009/001021 descrivono entrambe una serie di derivati di imidazo[4,5-*b*]piridina che fungono da inibitori dell'attività di Aurora chinasi e che sono quindi agenti terapeutici potenzialmente utili per il trattamento del cancro. Un particolare composto descritto in WO2009/001021 è mostrato sotto.



Questo particolare composto (noto come CCT137690) è un inibitore potente e oralmente biodisponibile di Aurora chinasi che inibisce la crescita di uno xeno-innesto *in vivo* di carcinoma del colon umano SW620 con concomitante modulazione dei biomarcatori coerente con l'impegno del bersaglio.²⁶ Tuttavia, lo sviluppo preclinico di questo composto è stato limitato dal suo stretto margine di sicurezza contro hERG⁴³ ($IC_{50} = 3,0 \mu M$)²⁶ e dalla sua bassa stabilità in microsomi epatici umani (86% metabolizzato dopo un'incubazione di 30 minuti, dati non pubblicati).

Uno scopo della presente invenzione è quindi quello di fornire degli inibitori oralmente biodisponibili dell'attività enzimatica di Aurora chinasi che siano adatti per la valutazione preclinica e clinica.

Pertanto, uno scopo della presente invenzione è quello di fornire degli inibitori oralmente biodisponibili dell'attività enzimatica di Aurora chinasi che possiedano una stabilità accettabile in microsomi umani, una ridotta inibizione dell'attività del citocromo P₄₅₀ e, nel caso di alcuni composti, un indice terapeutico più ampio contro hERG.

FLT3 è una chinasi trans-membrana che appartiene alla famiglia dei recettori tirosina chinasi (RTK) di classe III. Il legame del ligando di FLT3 (FL) al suo recettore porta a dimerizzazione, auto-fosforilazione e successiva attivazione delle vie di segnalazione a valle³⁷. Livelli elevati di espressione di FLT3 sono stati

riscontrati in blasti di leucemia mieloide acuta (AML) e in pazienti affetti da AML^{37,38} sono state identificate due classi principali di mutazioni, cioè duplicazioni interne in tandem (ITD) e mutazioni puntiformi nel dominio della tirosina chinasi (TKD). Le duplicazioni interne in tandem sono rivelate nel 20-25% dei pazienti con AML e le mutazioni puntiformi nel dominio della tirosina chinasi nel 5-10% dei pazienti con AML^{37,38}. Un certo numero di inibitori a molecola piccola di FLT3 sono stati valutati in sperimentazioni cliniche^{38,39}.

Esiste quindi un'ulteriore necessità di composti che abbiano una duplice funzione nell'inibire sia le Aurora chinasi che FLT3. Tali composti sarebbero utili per il trattamento di malattie e/o condizioni in cui sono implicate Aurora e/o FLT3, come ad esempio l'AML.

Un ulteriore scopo della presente invenzione è quindi quello di fornire composti che possiedono questa duplice attività.

SINTESI DELL'INVENZIONE

In un aspetto, la presente invenzione fornisce un composto o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile come qui definiti.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce una composizione farmaceutica comprendente un composto dell'invenzione come qui definito, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, e uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili.

In un altro aspetto, la presente invenzione si riferisce a un composto dell'invenzione come qui definito, o a un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o a una composizione farmaceutica come qui definita, per utilizzo nella terapia.

In un altro aspetto, la presente invenzione si riferisce a un composto dell'invenzione come qui definito, o a

un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o a una composizione farmaceutica come qui definita, per utilizzo nel trattamento di malattie o condizioni in cui è implicata l'attività di Aurora chinasi e/o di FLT3.

In un altro aspetto, la presente invenzione si riferisce all'utilizzo di un composto dell'invenzione come qui definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, nella preparazione di un medicamento nel trattamento di malattie o condizioni in cui è implicata l'attività di Aurora chinasi e/o di FLT3.

In un altro aspetto, la presente domanda descrive un metodo per trattare una malattia o condizione in cui è implicata l'attività di Aurora chinasi e/o di FLT3, in cui detto metodo comprende la somministrazione, a un soggetto che necessita di tale trattamento, di una quantità terapeuticamente efficace di un composto dell'invenzione come qui definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o di una composizione farmaceutica come qui definita.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce un composto, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o una composizione farmaceutica, come qui definiti, per utilizzo nel trattamento di un disturbo proliferativo, quale il cancro. In una particolare forma di realizzazione, il cancro è un cancro umano.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce l'utilizzo di un composto, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, nella preparazione di un medicamento per utilizzo nel trattamento di un disturbo proliferativo, quale il cancro. In una particolare forma di realizzazione, il cancro è un cancro umano.

In un altro aspetto, la presente domanda descrive un metodo per trattare un disturbo proliferativo, quale il cancro, in cui detto metodo comprende la somministrazione, a un soggetto che necessita di tale trattamento, di una quantità terapeuticamente efficace di un composto, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o di una composizione farmaceutica, come qui definiti. In una particolare forma di realizzazione, il cancro è un cancro

umano.

In un altro aspetto, la presente domanda descrive un composto, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o una composizione farmaceutica, come qui definiti, per utilizzo nella produzione di un effetto inibitorio su Aurora chinasi e/o FLT3.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce un metodo per produrre un effetto inibitorio *in vitro* su Aurora chinasi e/o FLT3, in cui detto metodo comprende la somministrazione di una quantità efficace di un composto, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

La presente domanda descrive inoltre un metodo per inibire la proliferazione cellulare *in vitro* o *in vivo*, in cui detto metodo comprende il contatto di una cellula con una quantità efficace di un composto come qui definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

La presente domanda descrive anche un metodo per sintetizzare un composto, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, come qui definiti.

La presente domanda descrive un composto, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, ottenibile o ottenuto o direttamente ottenuto tramite un metodo di sintesi qui definito.

La presente domanda descrive anche dei nuovi intermedi come qui definiti che sono adatti all'utilizzo in qualsiasi dei metodi di sintesi qui riportati.

Le caratteristiche preferite, adatte ed eventuali di un qualsiasi particolare aspetto della presente invenzione sono anche caratteristiche preferite, adatte ed eventuali di qualsiasi altro aspetto.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Definizioni

Salvo diversa indicazione, i seguenti termini utilizzati nella descrizione e nelle rivendicazioni hanno i seguenti significati riportati di seguito.

E' da intendersi che i riferimenti a "trattare" o "trattamento" includono la profilassi nonché l'alleviamento dei sintomi stabiliti di una condizione. "Trattare" o "trattamento" di uno stato, un disturbo o una condizione include quindi: (1) prevenire o ritardare la comparsa di sintomi clinici dello stato, del disturbo o della condizione che si sviluppa in un essere umano che può essere affetto o predisposto dallo/allo stato, dal/al disturbo o dalla/alla condizione ma che non ha ancora subito o mostrato sintomi clinici o subclinici dello stato, del disturbo o della condizione, (2) inibire lo stato, il disordine o la condizione, cioè arrestare, ridurre o ritardare lo sviluppo della malattia o di una sua recidiva (in caso di trattamento di mantenimento) o di almeno un suo sintomo clinico o subclinico, o (3) alleviare o attenuare la malattia, cioè provocare una regressione dello stato, del disturbo o della condizione o di almeno uno dei suoi sintomi clinici o subclinici.

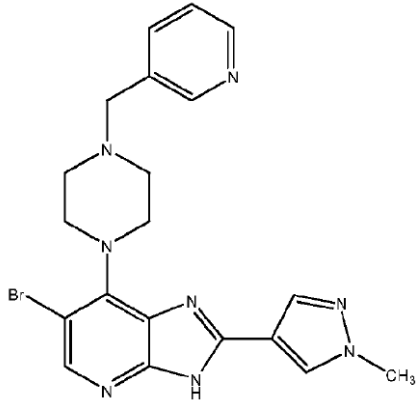
Per "quantità terapeuticamente efficace" si intende la quantità di un composto che, quando somministrato a un mammifero per il trattamento di una malattia, è sufficiente a effettuare tale trattamento per la malattia. La "quantità terapeuticamente efficace" varierà a seconda del composto, della malattia e della sua gravità e dell'età, del peso, ecc. del mammifero da trattare.

La frase "composto dell'invenzione" significa quei composti che sono qui descritti, sia genericamente che specificatamente.

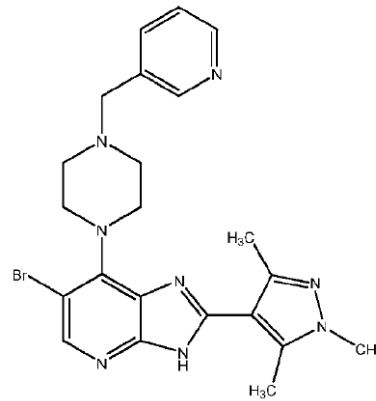
Composti dell'invenzione

Come precedentemente dichiarato, la Pubblicazione del Brevetto Internazionale n. WO2007/072017 descrive una serie di derivati di imidazo[4,5-*b*]piridina che fungono da inibitori dell'attività di Aurora chinasi. Due

particolari composti descritti in WO2007/072017 sono 6-bromo-2-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-7-(4-(piridin-3-ilmetil)piperazin-1-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina (Esempio 56) e 6-bromo-7-(4-(piridin-3-ilmetil)piperazin-1-il)-2-(1,3,5-trimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina (Esempio 57). Le strutture di questi composti sono mostrate di seguito.

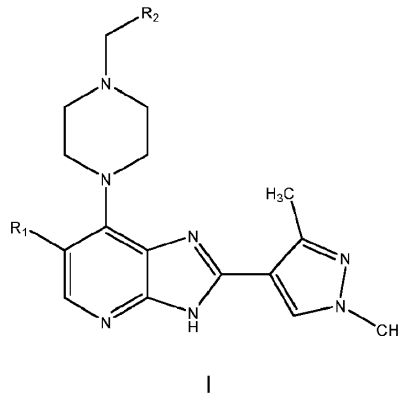


Esempio 56, WO2007/072017



Esempio 57, WO2007/072017

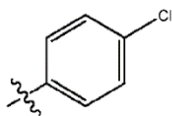
In un primo aspetto, la presente invenzione fornisce un composto di formula I mostrato sotto:



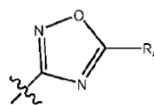
in cui:

R_1 è Br o Cl;

R_2 è scelto dalla formula II o dalla formula III mostrate sotto:




II



III

in cui R_a è idrogeno o metile;

o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

Nella definizione del gruppo R_2 di cui sopra, il simbolo  denota il punto di attacco del gruppo R_2 alla porzione $-CH_2-$ presente nei composti di formula I.

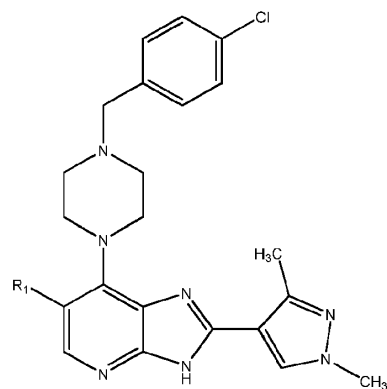
I composti della presente invenzione dimostrano un'inibizione ridotta dell'attività del citocromo P_{450} rispetto ai composti degli Esempi 56 e 57 di WO2007/072017. Alcuni composti della presente invenzione possiedono anche un indice terapeutico più ampio contro hERG rispetto ai composti degli Esempi 56 e 57 di WO2007/072017.

Particolari composti dell'invenzione includono, per esempio, composti di formula I, o loro sali farmaceuticamente accettabili, in cui, salvo diversa indicazione, ciascuno tra R_1 e R_2 ha qualsiasi dei significati definiti qui in precedenza o in qualsiasi dei paragrafi (1) a (5) che seguono:-

- (1) R_1 è Br;
- (2) R_1 è Cl;
- (3) R_2 è di formula II;
- (4) R_2 è di formula III, come qui definita;
- (5) R_2 è di formula III, come qui definita, e R_a è idrogeno;
- (6) R_2 è di formula III, come qui definita, e R_a è metile.

Opportunamente, R_1 è cloro.

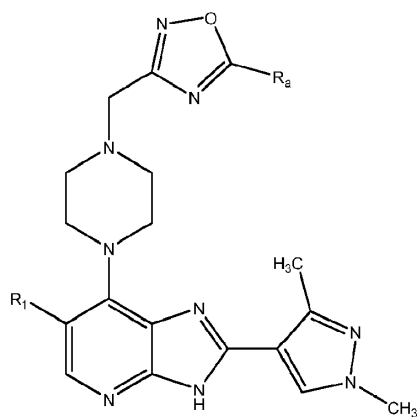
Opportunamente, R_2 è di formula II (cioè *para*-clorofenile). In un particolare gruppo di composti dell'invenzione, quindi, i composti hanno la formula strutturale Ia mostrata sotto:



Ia

in cui R_1 è come definito qui in precedenza, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

In un altro gruppo di composti dell'invenzione, R_2 è di formula III, cioè i composti hanno la formula strutturale Ib mostrata sotto:



Ib

in cui R_1 e R_a sono entrambi come definiti qui in precedenza, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

Particolari composti della presente invenzione includono qualsiasi dei seguenti:

6-Cloro-7-(4-(4-clorobenzil)piperazin-1-il)-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina;

3-((4-(6-Cloro-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-7-il)piperazin-1-il)metil)-1,2,4-ossadiazolo;

3-((4-(6-Cloro-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-7-il)piperazin-1-il)metil)-5-metil-1,2,4-ossadiazolo;

o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

Un sale farmaceuticamente accettabile adatto di un composto dell'invenzione è, per esempio, un sale di addizione acida di un composto dell'invenzione che è sufficientemente basico, per esempio un sale di addizione acida con, per esempio, un acido inorganico o organico, ad esempio acido cloridrico, bromidrico, solforico, fosforico, trifluoroacetico, formico, citrico o maleico.

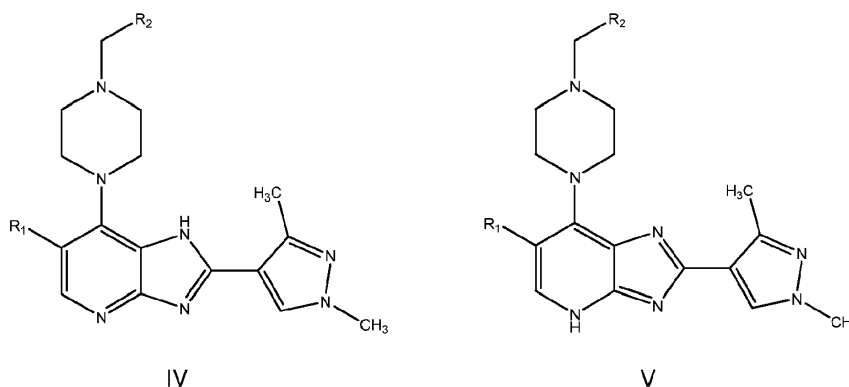
La presente invenzione comprende anche composti dell'invenzione come qui definiti che comprendono una o più sostituzioni isotopiche. Ad esempio, H può essere in qualsiasi forma isotopica, tra cui ^1H , $^2\text{H(D)}$ e $^3\text{H(T)}$; C può essere in qualsiasi forma isotopica, tra cui ^{12}C , ^{13}C e ^{14}C ; e simili.

E' anche da intendersi che certi composti dell'invenzione possono esistere in forma sia solvatata che non solvatata come, ad esempio, le forme idrate. E' da intendersi che l'invenzione comprende tutte tali forme solvate che possiedono attività inibitoria su Aurora chinasi e/o su FLT3.

E' anche da intendersi che certi composti dell'invenzione possono mostrare polimorfismo, e che l'invenzione comprende tutte tali forme che possiedono attività inibitoria su Aurora chinasi e/o su FLT3.

I composti dell'invenzione possono esistere in un certo numero di differenti forme tautomeriche e i riferimenti ai composti dell'invenzione includono tutte tali forme. A scanso di equivoci, quando un composto può esistere in una delle varie forme tautomeriche, e solo una di esse è specificamente descritta o mostrata, tutte le

altre sono nondimeno incluse nei composti dell'invenzione. Esempi di forme tautomeriche dei composti della presente invenzione includono i composti nella forma mostrata in formula I di cui sopra, nonché tautomeri di formula (IV) e (V) mostrati sotto.



in cui R_1 e R_2 sono come definiti qui in precedenza.

Composti dell'invenzione contenenti una funzione amminica possono anche formare N-ossidi. Un riferimento nel presente documento a un composto di formula I che contiene una funzione amminica include anche l'N-ossido. Quando un composto contiene diverse funzioni amminiche, uno o più atomi di azoto possono essere ossidati per formare un N-ossido. Esempi particolari di N-ossidi sono gli N-ossidi di un atomo di azoto di un eterociclo contenente azoto. Gli N-ossidi possono essere formati mediante trattamento della corrispondente ammina con un agente ossidante, come perossido di idrogeno o un per-acido (p.es. un acido perossicarbossilico), si veda ad esempio *Advanced Organic Chemistry*, di Jerry March, 4^a edizione, Wiley Interscience, pagine. Più in particolare, gli N-ossidi possono essere ottenuti con la procedura di L.W. Deady (*Syn. Comm.* 1977, 7, 509-514) in cui il composto amminico viene fatto reagire con acido *m*-cloroperossibenzoico (MCPBA), ad esempio, in un solvente inerte, quale diclorometano.

I composti dell'invenzione possono essere somministrati sotto forma di pro-farmaco che viene scisso nel

corpo umano o animale per rilasciare un composto dell'invenzione. Un pro-farmaco può essere utilizzato per alterare le proprietà fisiche e/o le proprietà farmacocinetiche di un composto dell'invenzione. Un pro-farmaco può essere formato quando il composto dell'invenzione contiene un gruppo o sostituente adatto a cui può essere attaccato un gruppo modificante le proprietà. Esempi di pro-farmaci includono derivati ammidici scindibili *in vivo* che possono essere formati in corrispondenza di un gruppo amminico in un composto dell'invenzione.

Di conseguenza, la presente invenzione include quei composti di formula I come definiti qui in precedenza quando resi disponibili mediante sintesi organica e quando resi disponibili all'interno del corpo umano o animale mediante scissione di un loro pro-farmaco. Di conseguenza, la presente invenzione include quei composti di formula I che vengono prodotti tramite mezzi di sintesi organica e anche quei composti che vengono prodotti nel corpo umano o animale mediante il metabolismo di un composto precursore, vale a dire che un composto di formula I può essere un composto prodotto sinteticamente o un composto prodotto metabolicamente.

Un pro-farmaco farmaceuticamente accettabile adatto di un composto di formula I è un pro-farmaco adatto, in base a un ragionevole giudizio medico, alla somministrazione al corpo umano o animale senza attività farmacologiche indesiderabili e senza indebita tossicità.

Sono state descritte varie forme di pro-farmaci, per esempio nei seguenti documenti:-

- a) Methods in Enzymology, Vol. 42, p. 309-396, edito da K. Widder, *et al.* (Academic Press, 1985);
- b) Design of Pro-drugs, edito da H. Bundgaard, (Elsevier, 1985);
- c) A Textbook of Drug Design and Development, edito da Krogsgaard-Larsen e H. Bundgaard, Capitolo 5 "Design and Application of Pro-drugs", di H. Bundgaard p. 113-191 (1991);
- d) H. Bundgaard, Advanced Drug Delivery Reviews, 8, 1-38 (1992);

- e) H. Bundgaard, *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 77, 285 (1988);
- f) N. Kakeya, *et al.*, Chem. Pharm. Bull., 32, 692 (1984);
- g) T. Higuchi and V. Stella, "Pro-Drugs as Novel Delivery Systems", A.C.S. Symposium Series, Volume 14; e
- h) E. Roche (editore), "Bioreversible Carriers in Drug Design", Pergamon Press, 1987.

Gli effetti *in vivo* di un composto di formula I possono essere esercitati in parte da uno o più metaboliti che si formano all'interno del corpo umano o animale dopo la somministrazione di un composto di formula I. Come detto sopra, gli effetti *in vivo* di un composto di formula I possono anche essere esercitati per mezzo del metabolismo di un composto precursore (un pro-farmaco).

Si riconoscerà anche che i composti di formula I possono anche essere legati covalentemente (in qualsiasi posizione adatta) ad altri gruppi quali, ad esempio, porzioni solubilizzanti (per esempio polimeri di PEG), porzioni che consentono loro di essere legati a un supporto solido (come, ad esempio, porzioni contenenti biotina) e ligandi di indirizzamento (quali anticorpi o frammenti di anticorpi).

Sintesi

Nella descrizione dei metodi di sintesi descritti di seguito e nei metodi di sintesi di riferimento utilizzati per preparare i materiali di partenza, è da intendersi che tutte le condizioni di reazione proposte, tra cui la scelta del solvente, l'atmosfera della reazione, la temperatura di reazione, la durata dell'esperimento e le procedure di lavoro, possono essere scelte da un esperto del settore.

Un esperto del settore della sintesi organica comprenderà che la funzionalità presente su varie porzioni della molecola deve essere compatibile con i reagenti e le condizioni di reazione utilizzati.

I materiali di partenza necessari possono essere ottenuti mediante procedure standard di chimica organica. La preparazione di tali materiali di partenza è descritta in combinazione con le seguenti varianti di processo rappresentative e negli Esempi allegati. In alternativa, i materiali di partenza necessari sono ottenibili con procedimenti analoghi a quelli illustrati che rientrano nell'abilità ordinaria di un chimico organico.

Si riconoscerà che durante la sintesi dei composti dell'invenzione nei processi definiti di seguito, o durante la sintesi di alcuni materiali di partenza, può essere desiderabile proteggere alcuni gruppi sostituenti per impedire la loro reazione indesiderata. Il chimico esperto riconoscerà la situazione in cui sarà richiesta tale protezione e la maniera in cui tali gruppi protettivi possano essere posizionati e successivamente rimossi.

Per esempi di gruppi di protezione, si veda uno dei molti testi generali sull'argomento, ad esempio "Protective Groups in Organic Synthesis" di Theodora Green (editore: John Wiley & Sons). I gruppi protettivi possono essere rimossi con qualsiasi metodo conveniente descritto in letteratura o noto al chimico esperto come appropriato per la rimozione del gruppo protettivo in questione, tali metodi essendo scelti in modo da effettuare la rimozione del gruppo protettivo con il minimo disturbo dei gruppi presenti altrove nella molecola.

Pertanto, se i reagenti includono, per esempio, gruppi come ammino, carbossi o idrossi, può essere desiderabile proteggere il gruppo in alcune delle reazioni qui menzionate.

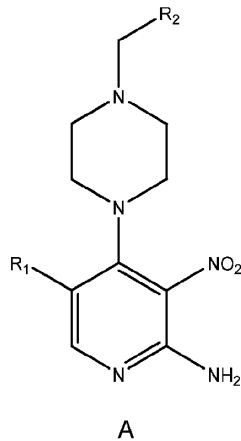
A titolo di esempio, un gruppo di protezione adatto per un gruppo ammino o alchilammino è, per esempio, un gruppo acile, ad esempio un gruppo alcanoile come acetile, un gruppo alcossicarbonile, ad esempio un gruppo metossicarbonile, etossicarbonile o *t*-butossicarbonile, un gruppo arilmetossicarbonile, ad esempio benzilossicarbonile, o un gruppo aroile, ad esempio benzoile. Le condizioni di de-protezione per i gruppi di protezione di cui sopra variano necessariamente con la scelta del gruppo di protezione. Quindi, ad esempio, un

gruppo acile come un gruppo alcanile o alcossicarbonile o un gruppo aroile può essere rimosso, ad esempio, mediante idrolisi con una base adatta, quale un idrossido di metallo alcalino, ad esempio idrossido di litio o di sodio. Alternativamente, un gruppo acile come un gruppo *terz*-butossicarbonile può essere rimosso, per esempio, mediante trattamento con un acido adatto, quale acido cloridrico, solforico o fosforico o acido trifluoroacetico, e un gruppo arilmetossicarbonile come un gruppo benzilossicarbonile può essere rimosso, per esempio, mediante idrogenazione su un catalizzatore come palladio su carbone o mediante trattamento con un acido di Lewis, ad esempio BF_3OEt_2 . Un gruppo di protezione alternativo adatto per un gruppo amminico primario è, ad esempio, un gruppo ftaloile che può essere rimosso mediante trattamento con una alchilammina, ad esempio dimetilamminopropilammina, o con idrazina.

I composti della presente invenzione possono essere preparati utilizzando le tecniche di sintesi generali descritte in WO2007/072017 e WO2009/001021, i cui contenuti integrali sono qui incorporati come citazione.

In un aspetto particolare, la presente invenzione fornisce un metodo per sintetizzare un composto di formula **I**, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, il metodo comprendendo:

a) far reagire un composto di formula A:



in cui R_1 e R_2 hanno ciascuno uno qualsiasi dei significati esposti qui in precedenza;

con 1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carbaldeide in presenza di un agente riducente adatto; e

b) eventualmente poi, e se necessario:

i) rimuovere qualsiasi gruppo di protezione presente;

ii) convertire il composto di formula I in un altro composto di formula I; e/o

iii) formare un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

Adeguatamente, la reazione tra il composto di formula A e 1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carbaldeide avviene in presenza di un solvente adatto. Per questa reazione può essere utilizzato qualsiasi solvente o miscela di solventi adatto/a. Esempi di solventi adatti includono DMSO, acqua, DMF e alcoli p.es. EtOH.

Adeguatamente, la reazione procede in presenza di un agente riducente adatto, come $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ acquoso.²⁶

Un esperto del settore sarà anche in grado di scegliere le condizioni di reazione appropriate da utilizzare al fine di facilitare questa reazione.

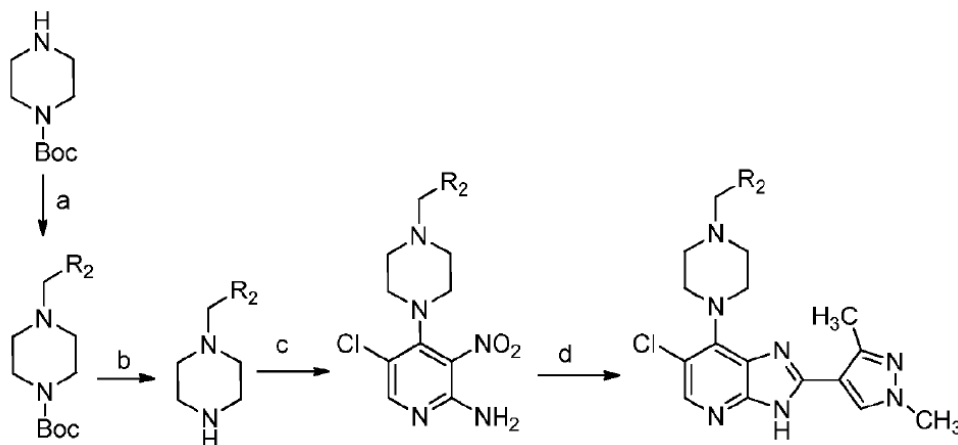
La reazione può anche essere condotta ad una temperatura elevata, ad esempio può essere utilizzata una temperatura compresa nell'intervallo di 50 a 190°C (a seconda della natura del solvente).

Il composto di formula I risultante può essere isolato e purificato utilizzando tecniche ben note nell'arte.

Il processo qui definito può inoltre comprendere la fase di sottoporre il composto di formula I ad uno scambio di sale, particolarmente in situazioni in cui il composto di formula I è formato come miscela di differenti forme saline. Lo scambio di sale prevede opportunamente di immobilizzare il composto di formula I su un supporto solido o su una resina adatto/a, e di eluire i composti con un acido appropriato per ottenere un singolo sale del composto di formula I.

I composti di formula A possono essere preparati mediante processi noti nell'arte.

Un esempio di una procedura adatta per la preparazione del composto di Formula I attraverso un intermedio di formula A è mostrato nello Schema 1 di seguito.



Reagenti e condizioni: le fasi (a) e (b) di cui sopra si riferiscono solo al derivato 1,2,4-ossadiazolo perché 1-(4-clorobenzil)piperazina e 1-((5-metil-1,2,4-ossadiazol-3-il)metil)piperazina sono disponibili in commercio: (a) per il derivato di 1,2,4-ossadiazolo: CH_2Cl_2 , 3-(clorometil)-1,2,4-ossadiazolo, Et_3N , 50°C ; (b) per il derivato di 1,2,4-ossadiazolo: TFA, CH_2Cl_2 , temperatura ambiente; (c) per derivati di 4-clorobenzile e 1,2,4-ossadiazolo: 2-ammino-4,5-dicloro-3-nitropiridina, $^i\text{Pr}_2\text{NEt}$, $^i\text{PrOH}$, riscaldamento; (d) per derivati di 4-clorobenzile e 1,2,4-ossadiazolo: 1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carbaldeide, EtOH, $1\text{M Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ aq., 80°C .

Schema 1

2-Ammino-4,5-dicloro-3-nitropiridina (4,5-dicloro-3-nitropiridin-2-ammina) e 2-ammino-5-bromo-4-cloro-3-nitropiridina (5-bromo-4-cloro-3-nitropiridin-2-ammina), precursori per la sintesi di derivati A di 2-ammino-3-nitropiridina, sono state preparate come descritto in precedenza²⁶ o tramite alogenazione di 2-ammino-4-cloro-3-nitropiridina (4-cloro-3-nitropiridin-2-ammina)⁴⁰.

Composizioni farmaceutiche

Secondo un ulteriore aspetto dell'invenzione, è fornita una composizione farmaceutica che comprende un composto dell'invenzione come definito qui in precedenza, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, in associazione con un diluente o veicolo farmaceuticamente accettabile.

Le composizioni dell'invenzione possono essere in una forma adatta per uso orale (ad esempio sotto forma di compresse, pastiglie, capsule dure o molli, sospensioni acquose o oleose, emulsioni, polveri o granuli disperdibili, sciroppi o elisir), per uso topico (ad esempio sotto forma di creme, pomate, gel o soluzioni o sospensioni acquose o oleose), per la somministrazione tramite inalazione (ad esempio sotto forma di una polvere finemente dispersa o di un aerosol liquido), per la somministrazione tramite insufflazione (ad esempio sotto forma di una polvere finemente dispersa) o per la somministrazione parenterale (ad esempio sotto forma di soluzione acquosa o oleosa sterile per somministrazione endovenosa, sottocutanea, intramuscolare, intraperitoneale o intramuscolare o sotto forma di supposta per somministrazione rettale).

Le composizioni dell'invenzione possono essere ottenute mediante procedure convenzionali utilizzando eccipienti farmaceutici convenzionali ben noti nella tecnica. Pertanto, le composizioni destinate all'uso orale possono contenere, per esempio, uno o più agenti coloranti, edulcoranti, aromatizzanti e/o conservanti.

Una quantità efficace di un composto della presente invenzione per utilizzo nella terapia di una malattia proliferativa è una quantità sufficiente ad alleviare sintomaticamente in un animale a sangue caldo, in particolare un essere umano, i sintomi dell'infezione, a rallentare la progressione dell'infezione, o a ridurre nei pazienti con sintomi di infezione il rischio di un peggioramento.

La quantità di principio attivo che viene combinata con uno o più eccipienti per produrre una forma di dosaggio singola varierà necessariamente a seconda dell'ospite trattato e della particolare via di somministrazione. Ad esempio, una formulazione destinata alla somministrazione orale all'uomo conterrà generalmente, per esempio, 0,5 mg a 0,5 g di agente attivo (più opportunamente 0,5 a 100 mg, ad esempio 1 a 30 mg) in combinazione con una quantità appropriata e conveniente di eccipienti che può variare tra circa 5 e circa 98% in peso della

composizione totale.

Le dimensioni della dose per scopi terapeutici o profilattici di un composto di formula I varieranno naturalmente a seconda della natura e della gravità delle condizioni, dell'età e del sesso dell'animale o del paziente e della via di somministrazione, secondo principi di medicina ben noti.

Nell'utilizzo di un composto dell'invenzione a scopo terapeutico o profilattico esso sarà generalmente somministrato in modo tale che venga ricevuta una dose giornaliera nell'intervallo, ad esempio, di 0,1 mg/kg a 30 mg/kg di peso corporeo, somministrata se richiesto in dosi suddivise. In generale, verranno somministrate dosi più basse quando si impiega una via parenterale. Pertanto, ad esempio, per la somministrazione endovenosa o intraperitoneale, verrà generalmente utilizzata una dose nell'intervallo, ad esempio, di 0,1 mg/kg a 30 mg/kg di peso corporeo. Analogamente, per la somministrazione tramite inalazione, verrà utilizzata una dose nell'intervallo, ad esempio, di 0,05 mg/kg a 25 mg/kg di peso corporeo. Può anche essere adatta la somministrazione orale, in particolare sotto forma di compresse. Tipicamente, le forme di dosaggio unitarie conterranno circa 0,5 mg a 0,5 g di un composto di questa invenzione.

Usi terapeutici e applicazioni

I composti dell'invenzione sono inibitori dell'attività di Aurora chinasi e di FLT3.

La presente domanda descrive un metodo per inibire l'attività di Aurora chinasi e/o FLT3 in una cellula, il metodo comprendendo la somministrazione a detta cellula di un composto di formula I come qui definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

La presente domanda descrive un metodo per inibire l'attività di Aurora chinasi e/o FLT3 *in vitro* o *in vivo*, detto metodo comprendendo il contatto di una cellula con una quantità efficace di un composto, o di un suo sale o

solvato farmaceuticamente accettabile, come qui definiti.

La presente domanda descrive un metodo per inibire l'attività di Aurora chinasi e/o FLT3 in un soggetto umano o animale che necessita di tale inibizione, il metodo comprendendo la somministrazione a detto soggetto di una quantità efficace di un composto di formula I come qui definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

L'Aurora chinasi può essere Aurora chinasi A, B o C.

In un aspetto, la presente invenzione fornisce un composto di Formula I, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o una composizione farmaceutica, come qui definiti, per utilizzo nella terapia.

La presente domanda descrive un composto di formula I come qui definito, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, per utilizzo nel trattamento di una malattia o condizione associata all'attività dell'Aurora chinasi (e/o all'attività di FLT3).

La presente domanda descrive l'utilizzo di un composto di formula I come qui definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, nella preparazione di un medicamento per utilizzo nel trattamento di una malattia o condizione associata all'attività dell'Aurora chinasi (e/o all'attività di FLT3).

La presente domanda descrive un metodo per trattare un disturbo proliferativo in un soggetto umano o animale, in cui il metodo prevede la somministrazione a detto soggetto di una quantità terapeuticamente accettabile di un composto di formula I come qui definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

In un altro aspetto ancora, la presente invenzione fornisce un composto di formula I come qui definito, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, per utilizzo nel trattamento di un disturbo proliferativo.

In un altro aspetto ancora, la presente invenzione fornisce l'utilizzo di un composto di formula I come qui

definito, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, nella preparazione di un medicamento per utilizzo nel trattamento di un disturbo proliferativo.

In un altro aspetto, la presente invenzione fornisce un composto, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o una composizione farmaceutica, come qui definiti, per utilizzo nel trattamento del cancro.

In un altro aspetto ancora, la presente invenzione fornisce l'utilizzo di un composto, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, come qui definiti, nella preparazione di un medicamento per utilizzo nel trattamento nel cancro.

In un altro aspetto ancora, la presente domanda descrive un metodo per trattare un cancro in un paziente che necessita di tale trattamento, in cui detto metodo comprende la somministrazione, a detto paziente, di una quantità terapeuticamente efficace di un composto, o di un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, o di una composizione farmaceutica, come qui definiti.

I composti dell'invenzione possono essere utili, ad esempio, per il trattamento del cancro del colon-retto, della mammella, del polmone, della prostata, del pancreas o della vescica e del rene o delle leucemie o dei linfomi.

In particolare, i composti della presente invenzione sono utili per il trattamento delle leucemie. E' stata dimostrata un'espressione elevata delle Aurora chinasi nella leucemia (linee cellulari e coorti di pazienti).³⁰⁻³³ Inoltre, la duplicazione interna in tandem del gene *FLT3* (*FLT3-ITD*) determina un'attivazione costitutiva della *FLT3* chinasi.³⁴ Significativamente, *FLT3-ITD* si presenta nel 20-35% degli adulti e nel 15% dei bambini con AML, conferendo una prognosi sfavorevole in entrambi i gruppi di età.³⁵

Pertanto, in una particolare forma di realizzazione, i composti sono destinati a trattare leucemie quali la leucemia mieloide acuta (AML), la sindrome mielodisplastica (MDS), la leucemia linfatica cronica (LLC) e il

mieloma multiplo. I composti della presente invenzione sono anche previsti essere utili per il trattamento del neuroblastoma.

E' previsto che i composti della presente invenzione siano di particolare beneficio in pazienti che non hanno avuto successo con il trattamento mediante le terapie standard. E' previsto che i composti della presente invenzione siano anche di valore per il trattamento di pazienti più anziani (per esempio di età superiore a 60 anni) affetti da leucemia, (p.es. AML) poiché si prevede che tali pazienti possano trarre beneficio dall'inibizione dell'Aurora chinasi.

Si prevede inoltre che i composti della presente invenzione siano di valore nel trattamento di bambini affetti da leucemia (per esempio, nuova diagnosi di AML con FLT3 mutata e AML infantile), così come dei neuroblastomi.

Vie di somministrazione

I composti dell'invenzione o una composizione farmaceutica comprendente il composto attivo possono essere somministrati a un soggetto attraverso qualsiasi via di somministrazione conveniente, che sia sistemica/periferica o topica (cioè nel sito dell'azione desiderata).

Le vie di somministrazione includono, ma non sono limitate a, quelle orali (p.es. tramite ingestione); buccali; sublinguali; transdermiche (tra cui, p.es., una benda, un cerotto, ecc.); transmucosali (tra cui, p.es., una benda, un cerotto, ecc.); intranasali (p.es. tramite spray nasale); oculari (p.es. tramite collirio); polmonari (p.es. mediante terapia di inalazione o di insufflazione utilizzando, per esempio, un aerosol, ad esempio attraverso la bocca o il naso); rettali (p.es. tramite supposta o clistere); vaginali (p.es. tramite pessario); parenterali, per esempio tramite iniezione, tra cui quella sottocutanea, intradermica, intramuscolare, endovenosa, endoarteriosa,

intracardiaca, intratecale, intraspinale, intracapsulare, sottocapsulare, intraorbitale, intraperitoneale, intratracheale, sottocuticolare, intra-articolare, subaracnoidea e intrasternale; mediante l'impianto di un deposito o di un serbatoio, ad esempio, per via sottocutanea o intramuscolare.

Terapie combinate

I composti dell'invenzione possono essere somministrati da soli come monoterapia oppure possono essere somministrati in combinazione con uno o più agenti terapeutici aggiuntivi. La scelta degli uno o più agenti terapeutici aggiuntivi varierà naturalmente a seconda della malattia o condizione da trattare e della sua gravità.

È comune utilizzare terapie combinate per trattare disturbi proliferativi, come il cancro. Pertanto, il trattamento anti-proliferativo qui definito può essere applicato come unica terapia oppure può comportare, oltre al composto dell'invenzione, la chirurgia o la radioterapia o la chemioterapia convenzionale. Tale chemioterapia può includere una o più delle seguenti categorie di agenti antitumorali:-

(i) altri farmaci anti-proliferativi/antineoplastici e loro combinazioni, come utilizzati nell'oncologia medica, quali agenti alchilanti (ad esempio cisplatino, ossaliplatino, carboplatino, ciclofosfamide, senape di azoto, melfalan, clorambucile, busulfano, temozolamide e nitrosouree); antimetaboliti (ad esempio gemcitabina e antifolati quali fluoropirimidine, come 5-fluorouracile e tegafur, raltitrexed, metotrexato, citosina arabinoside e idrossiurea); antibiotici antitumorali (ad esempio antracicline, come adriamicina, bleomicina, doxorubicina, daunomicina, epirubicina, idarubicina, mitomicina-C, dactinomicina e mitramicina); agenti antimitotici (ad esempio alcaloidi della Vinca, come vincristina, vinblastina, vindesina e vinorelbina e tassoidi come taxolo e taxotere e inibitori della polo-chinasi); e inibitori della topoisomerasi (ad esempio epipodofillotossine, come etoposide e teniposide, amsacrina, topotecan e camptotecina);

(ii) agenti citostatici, quali anti-estrogeni (ad esempio tamoxifene, fulvestrant, toremifene, raloxifene, droloxifene e iodoxifene), anti-androgeni (ad esempio bicalutamide, flutamide, nilutamide e ciproterone acetato), antagonisti di LHRH o agonisti di LHRH (ad esempio goserelina, leuprorelina e buserelina), progestinici (ad esempio megestrolo acetato), inibitori dell'aromatasi (ad esempio anastrozolo, letrozolo, vorazolo ed exemestano) e inibitori della 5 α -riduttasi, quale finasteride;

(iii) agenti anti-invasione [ad esempio inibitori della famiglia della c-Src chinasi, come 4-(6-cloro-2,3-metilendioossianilino)-7-[2-(4-metilpiperazin-1-il)etossi]-5-tetraidropiran-4-ilossichinazolina (AZD0530; Domanda di Brevetto Internazionale WO 01/94341), *N*-(2-cloro-6-metilfenil)-2-{6-[4-(2-idrossietil)piperazin-1-il]-2-metilpirimidin-4-ilamino}tiazol-5-carbossamide (dasatinib, BMS-354825; *J. Med. Chem.*, 2004, 47, 6658-6661) e bosutinib (SKI-606) e inibitori di metalloproteinasi, come marimastat, inibitori della funzione del recettore dell'attivatore del plasminogeno urochinasi o anticorpi contro eparanasi];

(iv) inibitori della funzione dei fattori di crescita: ad esempio tali inibitori includono anticorpi dei fattori di crescita e anticorpi dei recettori dei fattori di crescita (ad esempio l'anticorpo anti-erbB2 trastuzumab [Herceptin™], l'anticorpo anti-EGFR panitumumab [Vectibix®], l'anticorpo anti-erbB1 cetuximab [Erbix®, C225] e qualsiasi anticorpo dei fattori di crescita o dei recettori dei fattori di crescita descritto da Stern *et al.* Critical reviews in oncology/haematology, 2005, Vol. 54, pp. 11-29); tali inibitori includono anche inibitori della tirosina chinasi, ad esempio inibitori della famiglia del fattore di crescita epidermico (ad esempio inibitori della tirosina chinasi della famiglia EGFR, come *N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-metossi-6-(3-morfolinopropossi)chinazolin-4-ammina (gefitinib, ZD1839), *N*-(3-etinilfenil)-6,7-bis(2-metossietossi)chinazolin-4-ammina (erlotinib, OSI-774) e 6-acrilamido-*N*-(3-cloro-4-fluorofenil)-7-(3-morfolinopropossi)-chinazolin-4-ammina (CI 1033), inibitori della

tirosina chinasi erbB2, come lapatinib); inibitori della famiglia dei fattori di crescita degli epatociti; inibitori della famiglia dei fattori di crescita insulino-simili; inibitori della famiglia dei fattori di crescita derivati dalle piastrine, come imatinib e/o nilotinib (AMN107); inibitori delle serina/treonina chinasi (ad esempio inibitori della segnalazione Ras/Raf, come inibitori della farnesil transferasi, ad esempio sorafenib (BAY 43-9006), tipifarnib (R115777) e lonafarnib (SCH66336), inibitori della segnalazione cellulare attraverso MEK e/o AKT chinasi, inibitori di c-kit, inibitori di abl chinasi, inibitori di PI3 chinasi, inibitori di Plt3 chinasi, inibitori di CSF-1R chinasi, inibitori della chinasi del recettore dell'IGF (fattore di crescita insulino-simile); inibitori di Aurora chinasi (ad esempio AZD1152, PH739358, VX-680, MLN8054, R763, MP235, MP529, VX-528 e AX39459) e inibitori di chinasi ciclina-dipendenti, quali inibitori di CDK2 e/o CDK4;

(v) agenti anti-angiogenici come quelli che inibiscono gli effetti del fattore di crescita dell'endotelio vascolare, [ad esempio l'anticorpo anti-fattore di crescita delle cellule endoteliali vascolari bevacizumab (Avastin™) e per esempio, un inibitore della tirosina chinasi recettoriale VEGF, come vandetanib (ZD6474), vatalanib (PTK787), sunitinib (SU11248), axitinib (AG-013736), pazopanib (GW 786034) e 4-(4-fluoro-2-metilindol-5-ilossi)-6-metossi-7-(3-pirrolidin-1-ilproposs)chinazolina (AZD2171; Esempio 240 in WO 00/47212), composti come quelli descritti nelle Domande di Brevetto Internazionali WO 97/22596, WO 97/30035, WO 97/32856 e WO 98/13354 e composti che funzionano con altri meccanismi (per esempio linomide, inibitori della funzione dell'integrina $\alpha\beta3$ e angiostatina)];

(vi) agenti di danneggiamento vascolare, quali Combretastatina A4 e composti descritti nelle Domande di Brevetto Internazionali WO 99/02166, WO 00/40529, WO 00/41669, WO 01/92224, WO 02/04434 e WO 02/08213;

(vii) un antagonista del recettore dell'endotelina, ad esempio zibotentan (ZD4054) o atrasentan;

(viii) terapie anti-senso, ad esempio quelle che sono dirette ai bersagli elencati sopra, come ISIS 2503, un anti-senso anti-ras;

(ix) approcci di terapia genica, tra cui, ad esempio, l'utilizzo dei composti dell'invenzione in combinazione con approcci con adenovirus oncolitici per sostituire geni aberranti, come p53 aberrante o BRCA1 o BRCA2 aberranti, approcci GDEPT (terapia con enzimi gene-diretti attivanti pro-farmaci) come quelli che utilizzano la citosina deaminasi, la timidina chinasi o un enzima nitroriduttasi batterico e approcci per aumentare la tolleranza del paziente alla chemioterapia o alla radioterapia, come la terapia genica per la resistenza multi-farmaco; e

(x) approcci immunoterapici, compresi ad esempio approcci *ex-vivo* e *in-vivo* per aumentare l'immunogenicità delle cellule tumorali del paziente, come la trasfezione con citochine, quali interleuchina 2, interleuchina 4 o il fattore stimolante le colonie di granulociti-macrofagi, approcci per ridurre l'anergia delle cellule T, approcci che utilizzano cellule immunitarie trasfettate, quali cellule dendritiche trasfettate con citochine, approcci che utilizzano linee di cellule tumorali trasfettate con citochine e approcci che utilizzano anticorpi anti-idiotipici.

Tale trattamento congiunto/combinato può essere ottenuto mediante la somministrazione simultanea, sequenziale o separata dei singoli componenti del trattamento. Tali prodotti di combinazione impiegano i composti di questa invenzione entro l'intervallo di dosaggio descritto in precedenza e l'altro agente farmaceuticamente attivo entro l'intervallo di dosaggio approvato per esso.

Nella presente descrizione è fornita una combinazione adatta all'utilizzo nel trattamento di una malattia o condizione in cui è implicata l'attività della protein chinasi come qui definita (p.es. un cancro), comprendente un composto dell'invenzione come definito in precedenza, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, e un altro agente terapeutico (p.es. un agente antitumorale).

Nella presente descrizione è fornita una combinazione adatta all'utilizzo nel trattamento di un cancro (ad esempio un cancro che coinvolge un tumore solido) comprendente un composto dell'invenzione come definito in precedenza, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, e uno qualsiasi degli agenti antitumorali elencati in (i) - (ix) di cui sopra.

Nella presente descrizione è fornito un composto dell'invenzione, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, in combinazione con un agente antitumorale scelto da un agente elencato in (i) - (ix) di cui sopra.

Nella presente, dove viene utilizzato il termine "combinazione", si deve comprendere che ciò si riferisce a una somministrazione simultanea, separata o sequenziale. In un aspetto dell'invenzione, "combinazione" si riferisce alla somministrazione simultanea. In un altro aspetto dell'invenzione, "combinazione" si riferisce alla somministrazione separata. In un ulteriore aspetto dell'invenzione, "combinazione" si riferisce alla somministrazione sequenziale. Quando la somministrazione è sequenziale o separata, il ritardo nella somministrazione del secondo componente non dovrebbe essere tale da perdere l'effetto benefico della combinazione.

Nella presente descrizione è fornita una composizione farmaceutica che comprende un composto dell'invenzione, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, in combinazione con uno o più agenti terapeutici aggiuntivi (per esempio un agente antitumorale scelto da un agente elencato in (i) - (ix) di cui sopra), in associazione con un diluente o veicolo farmaceuticamente accettabile.

I composti della presente invenzione sono previsti essere particolarmente utili come parte di una terapia combinata con lo standard di cura esistente per il trattamento di pazienti anziani (cioè pazienti di età superiore ai

60 anni), poiché tali pazienti potrebbero trarre beneficio dall'inibizione della Aurora chinasi (indipendentemente dallo stato della loro FLT3).

Si prevede anche che i composti della presente invenzione siano particolarmente utili come parte di una terapia combinata con lo standard di cura esistente per il trattamento di bambini affetti da leucemia (p.es. AML) o neuroblastoma.

ESEMPI

BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

La Figura 1 mostra l'efficacia del composto dell'Esempio 1 contro xeno-trapianti di tumore umano MV4-11 in topi atimici: (A) Volumi tumorali relativi \pm SEM. (B) Peso corporeo dei topi.

La Figura 2 mostra: (A) Concentrazioni del farmaco nel plasma totale e nel tumore e concentrazioni del farmaco nel plasma libero dopo somministrazione a 50 e 100 mg/kg, campioni prelevati dopo 2 ore dalla dose finale. (B) Il composto dell'Esempio 1 inibisce la fosforilazione dell'istone H-3 in S10 e la fosforilazione di STAT5 in Y694 in xeno-trapianti di tumore umano MV4-11 (studio di 4 giorni). Sono stati ottenuti campioni di tumore 2 ore dopo la dose finale. L'istone totale H3, Stat5 totale e GAPDH sono stati utilizzati come controlli di caricamento.

SINTESI DI COMPOSTI

Esempi 1 a 3

Materiali e Metodi generali

I materiali di partenza, i reagenti ed i solventi essiccati disponibili in commercio sono stati utilizzati come forniti. La cromatografia su colonna flash è stata eseguita utilizzando il gel di silice 60 di Merck (0,025 - 0,04 mm). La cromatografia su colonna è stata eseguita anche su un'unità FlashMaster Personal utilizzando colonne di

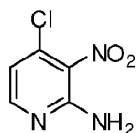
silice Flash Isolute o un sistema di purificazione Biotage SP1 che utilizza cartucce di silice Flash Biotage. La TLC preparativa è stata eseguita su piastre Analtech o Merck. La cromatografia a scambio ionico è stata eseguita utilizzando cartucce acide Isolute Flash SCX-II. Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati su un Bruker Avance-500. I campioni sono stati preparati sotto forma di soluzioni in un solvente deuterato e riferiti al picco di solvente interno non deuterato appropriato o al tetrametilsilano. Gli spostamenti chimici sono stati registrati in ppm (δ) a valle del tetrametilsilano. L'analisi LC-MS è stata eseguita su una LCT Waters con un modulo di separazione Waters Alliance 2795 e un rivelatore di assorbanza a doppia lunghezza d'onda Waters 2487 accoppiato a uno spettrometro di massa a tempo di volo Waters/Micromass LCT con sorgente ESI. La separazione analitica è stata effettuata a 30°C o su una colonna Merck Chromolith SpeedROD (RP-18e, $50 \times 4,6$ mm) utilizzando una velocità di flusso di 2 ml/min. in un'eluizione con gradiente di 3,5 minuti con rivelazione a 254 nm o su una colonna Merck Purospher STAR (RP-18e, 30×4 mm) utilizzando una velocità di flusso di 1,5 ml/min. in un'eluizione con gradiente di 3,5 minuti con rivelazione a 254 nm. La fase mobile è stata una miscela di metanolo (solvente A) e acqua (solvente B) contenenti entrambi acido formico allo 0,1%. L'eluizione con gradiente è stata la seguente: 1:9 (A/B) a 9:1 (A/B) per 2,25 min., 9:1 (A/B) per 0,75 min., e poi ripristino a 1:9 (A/B) per 0,3 min., infine 1:9 (A/B) per 0,2 min.).

L'analisi LC-HRMS è stata eseguita su una HPLC Agilent serie 1200 e rivelatore a schiera di diodi accoppiati a uno spettrometro di massa a tempo di volo a quadrupolo 6520 con sorgente duplice multimodale APCI/ESI. La separazione analitica è stata effettuata a 30°C su una colonna Merck Purospher STAR (RP-18e, 30×4 mm) utilizzando una velocità di flusso di 1,5 ml/min. in un'eluizione con gradiente di 4 minuti con rivelazione a 254 nm. La fase mobile è stata una miscela di metanolo (solvente A) e acqua (solvente B) contenenti entrambi

acido formico allo 0,1%. L'eluizione con gradiente è stata la seguente: 1:9 (A/B) a 9:1 (A/B) per 2,5 min., 9:1 (A/B) per 1 min., e poi ripristino a 1:9 (A/B) per 0,3 min., infine 1:9 (A/B) per 0,2 min. Per l'analisi HRMS sono state utilizzate le seguenti masse di riferimento: caffeina $[M+H]^+$ 195,087652; (esakis(1*H*,1*H*,3*H*-tetrafluoropentossi)fosfazene $[M+H]^+$ 922,009798) ed esakis(2,2-difluoroetossi)fosfatene $[M+H]^+$ 622,02896 o reserpina $[M+H]^+$ 609,280657.

Esempio 1 - Preparazione di 6-cloro-7-(4-(4-clorobenzil)piperazin-1-il)-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina

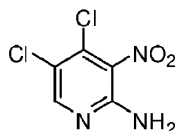
*4-Cloro-3-nitropiridin-2-ammina*⁴⁰



In un pallone a fondo tondo da 100 ml contenente 2-amino-4-cloropiridina (0,480 g, 3,75 mmoli) raffreddato in un bagno di ghiaccio è stato aggiunto acido solforico concentrato (5,4 g). La miscela di reazione è stata agitata per 5 minuti e poi è stato aggiunto goccia a goccia acido nitrico (70%; 0,36 g). La miscela di reazione è stata agitata a 0°C per 10 minuti, poi riscaldata fino a 55°C e agitata a questa temperatura per 1 ora. Essa è stata raffreddata fino a temperatura ambiente e diluita con acqua ghiacciata. Il pH è stato accuratamente regolato a ~ 7,5 con 10% NaOH acquoso, al che si è formato un precipitato giallo. Questo è stato rimosso tramite filtrazione, lavato con acqua ed essiccato sotto vuoto su P₂O₅. Il prodotto è stato purificato mediante cromatografia su colonna di silice (eluizione con diclorometano) per fornire in ordine di eluizione: 4-cloro-3-nitropiridin-2-ammina come solido giallo (0,210 g, 32%), ¹H-NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆) 6,87 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, piridina C-H), 7,21 (s, 2H, NH₂), 8,11 (d, *J* = 5,2 Hz, 1H, piridina C-H).

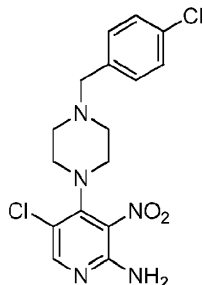
4-Cloro-5-nitropiridin-2-ammina (0,080 g, 12%): $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) 6,58 (s, 1H, piridina C-H) 7,58 (s, 2H, NH_2), 8,79 (s, 1H, piridina C-H).

4,5-Dicloro-3-nitropiridin-2-ammina



4-Cloro-3-nitropiridin-2-ammina (0,10 g, 0,58 mmoli) è stata dissolta in acetonitrile secco (20 ml). Alla soluzione agitata è stata quindi aggiunta *N*-clorosuccinimide (0,094 g, 0,70 mmoli) e la miscela di reazione è stata riscaldata a 80°C per 1 ora. Le sostanze volatili sono state rimosse sotto vuoto e il residuo è stato purificato mediante cromatografia su colonna di silice (eluizione con diclorometano) per fornire il composto del titolo come polvere di colore marrone chiaro (0,125 g, 85%). $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) 7,35 (s, 2H, NH_2), 8,36 (s, 1H, 6-H).

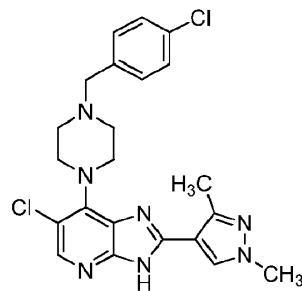
5-Cloro-4-(4-(4-clorobenzil)piperazin-1-il)-3-nitropiridin-2-ammina



A una miscela di 2-ammino-4,5-dicloro-3-nitropiridina (0,152 g, 0,73 mmoli) e isopropanolo (22 ml) è stata aggiunta 1-(4-clorobenzil)piperazina (0,165 g, 0,78 mmoli) seguita da diisopropiletilammina (0,17 ml, 0,97 mmoli). La miscela di reazione è stata riscaldata a 45°C per 18 h, poi lasciata raffreddare fino a temperatura ambiente e diluita con isopropanolo (5 ml). Il precipitato è stato raccolto tramite filtrazione, lavato con

isopropanolo e dietiletere. Il composto del titolo è stato quindi ottenuto come solido giallo (0,215 g, 77%); $^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) 2,48 (br s, oscurato dal picco di DMSO, 4H, piperazina C-H), 3,06 (br t, $J = 4,3$ Hz, 4H, piperazina C-H), 3,52 (s, 2H, $\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 6,95 (s, 2H, NH_2), 7,35 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) e 7,38 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) (3,5-ArH e 2,6-ArH), 8,06 (s, 1H, 6-H); LC - MS (ESI, m/z): $R_t = 1,70$ min. - 382, 384, 386 [(M+H) $^+$, Cl_2 pattern isotopico].

6-Cloro-7-(4-(4-clorobenzil)piperazin-1-il)-2-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo(4,5-b)piridina



A una miscela di 5-cloro-4-(4-(4-clorobenzil)piperazin-1-il)-3-nitropiridin-2-ammina (0,076 g, 0,20 mmoli) ed EtOH (4,0 ml) è stato aggiunto 1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carbaldeide (0,027 g, 0,22 mmoli) seguito da una soluzione acquosa preparata di fresco di $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (1M; 0,85 ml, 0,85 mmoli). La miscela di reazione è stata agitata a 80°C per 24 ore, quindi è stata lasciata raffreddare fino a temperatura ambiente, concentrata sotto vuoto, e il residuo è stato fatto assorbire su gel di silice e posto su una colonna di silice isolate da 10 g. L'eluizione con etilacetato/diclorometano (v/v; 1:1), e poi con 4% metanolo in etilacetato/diclorometano (v/v; 1:1) ha fornito il composto del titolo come solido bianco dopo triturazione con dietiletere (0,023 g, 25%).

$^1\text{H-NMR}$ (500 MHz, DMSO- d_6) 2,51 (s, oscurato dal picco del solvente, pirazolo 3- CH_3), 2,57 (br s, 4H, piperazina C-H), 3,54 (s, 2H, N- $\text{CH}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 3,68 (br s, 4H, piperazina C-H), 3,84 (s, 3H, pirazolo N-Me), 7,37 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) e 7,40 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H) ($\text{C}_6\text{H}_4\text{Cl}$), 8,02 (s, 1H), e 8,18 (s, 1H) (pirazolo 5-H, e imidazo[4,5-

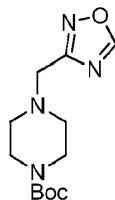
b]piridina 5-H), 12,95 (br s, 1H, imidazo[4,5-*b*]piridina N-H); LC - MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,97 min. - 456, 458, 460 [(M+H)⁺, Cl₂ pattern isotopico].

HRMS: Osservata: 456,1457, calcolata per C₂₂H₂₄Cl₂N₇ (M+H)⁺: 456,1465.

Questo composto è stato anche prodotto in grandi quantità varianti tra 0,80 e 1,80 g e in rese varianti tra 54% e 70%. Lo stesso metodo è stato utilizzato come descritto sopra ma durante la fase di lavorazione, la miscela di reazione è stata suddivisa tra acqua e cloroformio. Lo strato acquoso è stato estratto con cloroformio ed etilacetato e le sostanze organiche combinate sono state essiccate e concentrate sotto vuoto. E' stato anche utilizzato DMSO come solvente al posto di EtOH, e in questa occasione la miscela di reazione è stata agitata a 120°C per 3 ore.

Esempio 2 - Preparazione di 3-((4-(6-cloro-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-7-il)piperazin-1-il)metil)-1,2,4-ossadiazolo

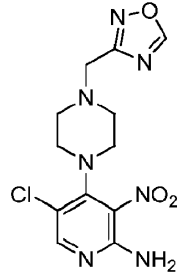
terz-Butil-4-((1,2,4-ossadiazol-3-il)metil)piperazin-1-carbossilato



A una soluzione di Boc-piperazina (571 mg, 3,07 mmoli) e 3-(clorometil)-1,2,4-ossadiazolo (400 mg, 3,37 mmoli) in CH₂Cl₂ (30 ml) è stata aggiunta trietilammina (1,70 ml, 12,3 mmoli). La reazione è stata agitata per 22 h a 50°C prima di essere concentrata sotto vuoto per dare un solido bianco oleoso grezzo. La purificazione è stata eseguita mediante cromatografia flash su gel di silice (4 x 12) eluendo con MeOH/CH₂Cl₂ (5%) per ottenere il composto del titolo (555 mg, 67%) come solido bianco. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 1,43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2,52

(app t, $J = 4,9$ Hz, 4H, CH₂), 3,45 (app t, $J = 4,9$ Hz, 4H, CH₂), 3,78 (s, 2H, CH₂C-), 8,71 (s, 1H, CH_{ar}); LC - MS (ESI, m/z): Rt = 1,67 min. - 213 (M - ^tBu)⁺, 169 (M - Boc)⁺.

4-(4-((1,2,4-Ossadiazol-3-il)metil)piperazin-1-il)-5-cloro-3-nitropiridin-2-ammina

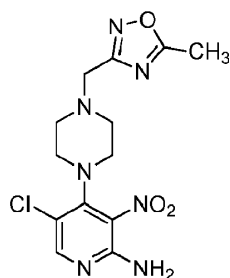


A una soluzione di *terz*-butil-4-((1,2,4-ossadiazol-3-il)metil)piperazin-1-carbossilato (213 mg, 0,790 mmoli) in CH₂Cl₂ (18 ml) è stato aggiunto TFA (1,8 ml, 23,8 mmoli) e la soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora e mezza. La reazione è stata concentrata sotto vuoto, azeotropizzando con toluene (x2) ed essiccata in un essiccatore sotto vuoto (contenente KOH) durante la notte per dare un olio giallo. L'olio grezzo è stato dissolto in ⁱPrOH (4,4 ml) e sono stati aggiunti sia 2-ammino-3-nitro-4,5-dicloropiridina (190 mg, 0,752 mmoli) che DIPEA (520 μ l, 3,00 mmoli). La soluzione è stata agitata a 50°C per 4 ore. Durante il raffreddamento è uscito di soluzione un precipitato giallo che è stato filtrato, lavato con Et₂O, essiccato sotto vuoto per ottenere il composto del titolo come solido giallo (165 mg, 0,486, 65%). Il filtrato è stato concentrato sotto vuoto per dare 715 mg di solido giallo oleoso. La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia flash su gel di silice (4 x 11) eluendo con EtOAc/esano (40-50%) per ottenere il composto del titolo (42 mg, 16%) come solido giallo.

¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 2,74 (app t, $J = 4,1$ Hz, 4H, -CH₂-), 3,25 (t, $J = 4,8$ Hz, 4H, -CH₂-), 3,85 (s, 2H, -CH₂C-), 5,77 (s, 2H, NH₂), 7,99 (s, 1H, CH_{ar}), 8,72 (s, 1H, -C(Cl)CH-).

LC - MS (ESI, m/z): Rt = 1,56 min. - 340, 342 [(M + H)⁺, Cl pattern isotopico].

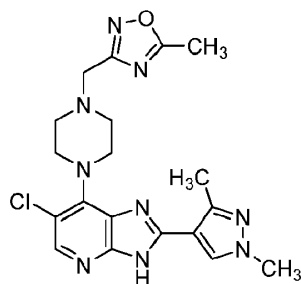
2-Amino-5-cloro-4-(4-(5-metil-1,2,4-ossadiazol-3-il)metil)piperazin-1-il)-3-nitropiridina



1-[(5-Metil-1,2,4-ossadiazol-3-il)metil]piperazina cloridrato (217 mg, 0,99 mmoli) e 2-ammino-4,5-dicloro-3-nitropiridina (208 mg, 1,0 mmole) sono stati agitati in 2-propanolo (5 ml) ed è stata aggiunta diisopropiletilammina (523 μ l, 387 mg, 3,0 mmoli). La miscela è stata agitata e riscaldata a 45°C per 23 ore. La reazione è stata raffreddata e il prodotto è stato rimosso tramite filtrazione e lavato con 2-propanolo. L'essiccazione sotto vuoto ha dato il prodotto (246 mg, 69%). ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 2,63 (s, 3H, CH₃), 2,77 (br m, 4H, piperazina C-H), 3,29 (m, 4H, piperazina C-H), 3,76 (s, 2H, CH₂), 5,27 (s, 2H, NH₂), 8,02 (s, 1H, piridina 6-H).

LC - MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,66 min. - 354 (M + H)⁺, isotopo ³⁵Cl.

3-((4-(6-Cloro-2-(1,3-dimetil-1H-pirazol-4-il)-3H-imidazo[4,5-b]piridin-7-il)piperazin-1-il)metil)-5-metil-1,2,4-ossadiazolo



A una soluzione di 5-cloro-4-(4-((5-metil-1,2,4-ossadiazol-3-il)metil)piperazin-1-il)-3-nitropiridin-2-ammina (60,0 mg, 0,170 mmoli) e 1,3-dimetil-1H-pirazol-4-carbaldeide (22,2 mg, 0,179 mmoli) in EtOH (3,8 ml)

è stato aggiunto 1M Na₂S₂O₄ (0,678 ml, 0,678 mmoli, preparato fresco) e la soluzione è stata riscaldata fino a 80°C e agitata per 16 ore aperta all'aria. Una volta raffreddata, la reazione è stata fatta evaporare sotto vuoto e il residuo è stato caricato a secco su silice. La purificazione è stata effettuata mediante cromatografia flash su gel di silice (3 x 14) eluendo con MeOH/CH₂Cl₂ (5-7,5%) per ottenere il composto del titolo come solido giallo chiaro. La ricristallizzazione in EtOAc/Et₂O ha dato il composto del titolo (20 mg, 27%) come solido biancastro. Il filtrato è stato concentrato sotto vuoto, una quantità aggiuntiva di composto del titolo (12 mg, 16%) come solido giallo chiaro. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃) 2,60 (s, 3H, CH₃), 2,62 (s, 3H, CH₃), 2,81 (app t, *J* = 4,5 Hz, 4H, CH₂), 3,76 (s, 2H, -CH₂-), 3,87 (app s, 4H, CH₂) 3,90 (s, 3H, NCH₃), 7,77 (br s, 1H, CH_{ar}), 7,96 (br s, 1H, CH_{ar}), 12,18 (s, 1H, NH);

LC - MS (ESI, *m/z*): Rt = 1,95 min. - 428, 430 [(M + H)⁺, Cl pattern isotopico];

HRMS: Osservata: 450,1527, calcolata per C₁₉H₂₂N₉OCiNa (M+Na)⁺: 450,1528.

VALUTAZIONE DEI COMPOSTI DEGLI ESEMPLI 1 A 3

Materiali e Metodi generali

Saggi su Aurora chinasi: i valori IC₅₀ di Aurora chinasi sono stati determinati come descritto in precedenza.^{26,36}

Saggio sulla vitalità cellulare: i valori GI₅₀ (concentrazione che inibisce la crescita cellulare del 50%) sono stati determinati come descritto in precedenza.^{26,36}

Determinazione dei valori IC₅₀ cellulari dell'Esempio 1 per l'inibizione di Aurora A e di Aurora B:

Aurora A etichettata con Myc è stata trasfettata in cellule Hela utilizzando Lipofectamina LTX in piastre da 24 pozzetti e, 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state trattate con concentrazioni diverse dell'Esempio

1 per 2 ore. Le cellule sono state poi lisate in 2X tampone campione LDS. Le proteine di diversi campioni sono state risolte su gel al 4-12% di Bis-Tris NuPage (Invitrogen) e analizzate mediante western blotting utilizzando anticorpi contro P-istone H3 (S10) e P-Aurora A (T288). Le bande per P-istone H3 e P-Aurora A sono state quantificate utilizzando il software Image J e i valori IC₅₀ sono stati calcolati utilizzando Graphpad Prism.

Stabilità in microsomi epatici di topo:

I composti (10 µM) sono stati incubati con microsomi epatici di topo CD1 maschio (1 mg.ml⁻¹) in presenza di NADPH (1 mM), UDPGA (2,5 mM) e MgCl₂ (3 mM) in soluzione salina tamponata con fosfato (10 mM) a 37°C. Le incubazioni sono state condotte per 0 e 30 minuti. Sono state generate incubazioni di controllo mediante omissione di NADPH e UDPGA dalla reazione di incubazione. La percentuale di composto rimanente è stata determinata dopo analisi mediante LCMS.

Stabilità in microsomi epatici umani:

I composti (10 µM) sono stati incubati con microsomi epatici umani combinati di genere misto (1 mg.ml⁻¹) in presenza di NADPH (1 mM), UDPGA (2,5 mM) e MgCl₂ (3 mM) in soluzione salina tamponata con fosfato (10 mM) a 37°C. Le incubazioni sono state condotte per 0 e 30 minuti. Sono state generate incubazioni di controllo mediante omissione di NADPH e UDPGA dalla reazione di incubazione. La percentuale di composto rimanente è stata determinata dopo analisi mediante LCMS.

Inibizione di hERG: Tutte le percentuali di inibizione di hERG alla concentrazione del composto di 10 µM sono state determinate tramite Millipore in un saggio di elettrofisiologia cellulare ad alte prestazioni per l'inibizione della corrente di coda di hERG⁴¹, e i valori sono riportati come media di determinazioni multiple. Il controllo negativo del veicolo acquoso DMSO allo 0,3% ha dato un'inibizione del 7-16%. Il controllo positivo Cisapride (1

μM) ha dato un'inibizione del 96-104%. Tutti i valori IC_{50} di hERG sono stati determinati tramite Millipore⁴¹, e la IC_{50} di hERG per l'Esempio 1 è stata anche determinata da Cyprotex plc tramite misurazione delle correnti di coda di hERG mediante blocco del voltaggio in cellula intera.⁴²

Proprietà fisico-chimiche: le misurazioni LogD e pKa sono state eseguite da Pharmorphix® Solid State Services, membro del gruppo Sigma-Aldrich, Cambridge, Regno Unito.

Profilo di selettività di chinasi: il tracciamento del profilo delle chinasi utilizzando la tecnologia KINOMEScan™ e determinazioni K_d è stato eseguito da KINOMEScan, una divisione di DiscoverX Corporation, San Diego, California, USA; www.kinomescan.com.

PK *in vivo* completo (composto dell'Esempio 1): alcuni topi (femmine Balb/C) sono stati sottoposti a somministrazione p.o. o i.v. con il composto dell'Esempio 1 (5 mg kg^{-1}) in 10% DMSO, 5% Tween 20 in soluzione salina. Dopo la somministrazione, i topi sono stati sacrificati a 5, 15 e 30 minuti e 1, 2, 4, 6 e 24 ore. Il sangue è stato prelevato mediante puntura cardiaca e centrifugato per ottenere campioni di plasma. I campioni di plasma (100 μl) sono stati aggiunti allo standard interno analitico (Olomucina; SI), seguito da precipitazione proteica con 300 μl di metanolo. In seguito a centrifugazione ($1.200 \times g$, 30 min., 4°C), i surnatanti risultanti sono stati analizzati per i livelli del composto dell'Esempio 1 mediante LCMS utilizzando una colonna analitica in fase inversa Acquity UPLC C18 (Waters, $50 \times 2,1 \text{ mm}$) ed ESI MRM in modalità di ioni positivi su un sistema di cromatografia liquida Agilent 1200 accoppiato a uno spettrometro di massa a triplo quadrupolo 6410 (Agilent Ltd.).

Studio sull'efficacia dello xeno-trapianto di tumore umano: le procedure implicanti animali sono state condotte nell'ambito delle linee guida stabilite da "The Institute of Cancer Research's Animal Ethics Committee" e in conformità con le linee guida nazionali: Workman P, Aboagye EO, Balkwill F, Balmain A, Bruder G, Chaplin

DJ, Double JA, Everitt J, Farningham D, Glennie MJ, Kelland LR, Robinson V, Stratford IJ, Tozer GM, Watson S, Wedge SR, Eccles SA. Guidelines for the welfare and use of animals in cancer research. *Brit J Cancer* 102: 1555-1577, 2010.

Topi atimici CrTacNcr-*Fox1(nu)* di sesso femminile sono stati sottoposti a impianto per via sottocutanea con 10^7 cellule leucemiche *FLT3-ITD MV4-11*. Quando gli xeno-trapianti erano ben consolidati (10 giorni dopo l'impianto, volume medio dei tumori di almeno 100 mm^3) gli animali sono stati trattati con il veicolo (10% DMSO, 20% PEG 400, 5% Tween 80 e 65% acqua) o con il composto dell'Esempio 1 somministrato per via orale in due dosi, 50 mg/kg e 100 mg/kg (n = 5 per gruppo). La somministrazione è stata effettuata due volte al giorno per 7 giorni e una volta al giorno per altri 4 giorni.

Studio PK/PD: è stato condotto uno studio PK/PD di 4 giorni mediante somministrazione orale del veicolo come sopra o di 50 mg/kg e 100 mg/kg del composto dell'Esempio 1 due volte al giorno in topi atimici con xeno-trapianti di MV4-11 ben consolidati (17 giorni dopo l'impianto). Sono stati prelevati campioni di plasma e di tumore 2 ore e 6 ore dopo le dosi finali.

Risultati

Attività di Aurora chinasi, attività cellulare, stabilità in microsomi, inibizione di hERG e proprietà fisico-chimiche

L'attività dei composti esemplificati contro Aurora A (saggio biochimico), la GI50 cellulare in cellule SW620 e hERG è mostrata nella Tabella 1 sottostante insieme a dati relativi alla stabilità nei microsomi di questi composti e ai rispettivi valori clogP.

Tabella 1

Esempio n.	Aurora-A IC ₅₀ (μM)	SW620 GI ₅₀ (μM)	MLM/HLM ^b	hERG IC ₅₀ (μM)	clogP ²⁷
Es. 56 di WO2007/072017	0.032 ^a	n.d.		5.5	2.78
Es. 57 di WO2007/072017	0.300 ^a	n.d.		10.8	2.72
1	0.038 ± 0.029	0.283 ± 0.227	34%/10%	>25	4.81 ^c
2	0.040 ± 0.015	1.175 ± 0.653	67%/22%	11.0	1.45
3	0.052 ^a	1.1 ^a	58%/20%	9.5	1.72

Per le determinazioni della IC₅₀ per Aurora-A e della GI₅₀ per SW620, i risultati sono valori medi di due determinazioni indipendenti o medie (± DS) per $n > 2$ se non diversamente specificato.

^a I risultati sono valori medi per campioni eseguiti in triplicato.

^b MLM/HLM: percentuale del composto progenitore metabolizzata dopo un'incubazione di 30 min.

^c LogD_{7.4} = 3,84 (valore determinato sperimentalmente).

n.d. = non determinato.

Il composto dell'Esempio 1 mostrava un'attività inibitoria inferiore contro hERG rispetto ai composti degli Esempi 56 e 57 di WO2007/072017.

Sulla base di questi risultati, il composto dell'Esempio 1 è stato selezionato per ulteriori caratterizzazioni *in vitro* e *in vivo*.

Selettività di chinasi

La selettività di chinasi è stata valutata tracciando il profilo dell'Esempio 1 in un pannello di 442 chinasi (386 chinasi non mutanti) a una concentrazione di 1 μM utilizzando la tecnologia KINOMEScan™.²⁸ Il punteggio di selettività S(10), calcolato dividendo il numero di chinasi non mutanti per le quali è stata osservata una competizione >90% nel saggio (questo è misurato come <10% del controllo) per il numero totale di chinasi non

mutanti testate, è stato determinato essere di 0,057, cioè 22 positività sulle 386 chinasi non mutanti testate. Aurora-A, -B e -C venivano potentemente inibite con % dei valori di controllo determinate rispettivamente essere di 3,4%, 1% e 16%. Questo screening primario ha rivelato anche una competizione superiore al 94% per FLT3 chinasi e mutanti di FLT3, tra cui FLT3-ITD, FLT3(D835Y) e FLT3(D835H).

Le attività inibitorie su FLT3 e Aurora del composto dell'Esempio 1 sono state successivamente confermate mediante determinazione del valore Kd (tecnologia KINOMEScan™), come mostrato nella Tabella 2.

Tabella 2: valori Kd per il composto dell'Esempio 1

Chinasi	Kd (nM)
Aurora-A	7.5
Aurora-B	48
FLT3	6.2
FLT3(D835H)	11
FLT3(D835Y)	14
FLT3-ITD	38
FLT3(K663Q)	5.1
FLT3(N841I)	16
FLT3(R834Q)	110

Gli esempi 2 e 3 erano anche potenti inibitori di FLT3 e FLT3-ITD. I valori Kd dell'Esempio 2 contro FLT3 e FLT3-ITD sono stati determinati essere rispettivamente di 4,4 nM e 14 nM. Analogamente, i valori Kd dell'Esempio 3 contro FLT3 e FLT3-ITD sono stati determinati essere rispettivamente di 5,6 nM e 26 nM.

Considerati complessivamente, questi dati indicano che il composto dell'Esempio 1 è un potente inibitore duplice di FLT3 e Aurora chinasi con poche attività su chinasi fuori bersaglio sul chinoma.

Valutazione del saggio cellulare

Coerente con una duplice attività di inibizione su FLT3/Aurora, il composto dell'Esempio 1 mostrava

attività anti-proliferativa in una gamma di linee di cellule tumorali umane, tra cui il carcinoma del colon umano HCT116 ($GI_{50} = 0,300 \mu\text{M}$) e le linee cellulari AML *FLT3*-ITD positive umane MOLM-13 ($GI_{50} = 0,104 \mu\text{M}$) e MV4-11 ($GI_{50} = 0,291 \mu\text{M}$). Nelle cellule HeLa, il composto dell'Esempio 1 inibiva sia Aurora-A che Aurora-B cellulari con valori IC_{50} rispettivamente di $0,030 \mu\text{M}$ e $0,148 \mu\text{M}$. In questi saggi cellulari, la riduzione della fosforilazione di H3 in S10 è stata utilizzata come biomarcatore per l'inibizione di Aurora-B, e l'auto-fosforilazione di Aurora-A in T288 come biomarcatore per l'inibizione di Aurora-A.²⁹

PK *in vivo*

I risultati della PK *in vivo* per il composto dell'Esempio 1 nel topo sono riportati nella Tabella 3. Esso è un composto altamente biodisponibile per via orale ($F = 100\%$) con clearance determinata a $0,058 \text{ l/h}$ ($\sim 48 \text{ ml/min./kg}$) e V_d a $0,066 \text{ l}$ ($\sim 3,3 \text{ l/kg}$).

Tabella 3: Composto dell'Esempio 1: legame alle proteine plasmatiche (PPB) di topo e parametri PK

(somministrazione iv: 5 mg/kg, somministrazione orale: 5 mg/kg)

PPB (topo)	$t_{1/2}$, (iv) (h)	Cl, (iv) (l/h)	AUCinf, (iv) h.nmol/l	V_d (l)	F% (po)
97.3±0.8	0.84	0.058	3753	0.066	100

Modello di xeno-trapianto di AML

L'attività del composto dell'Esempio 1 in un modello di xeno-trapianto di AML umano è mostrata nella Figura 1.

Facendo riferimento alla Figura 1, si può vedere che il composto dell'Esempio 1 inibiva fortemente la crescita di xeno-trapianti di tumore umano MV4-11 in maniera dose-dipendente senza tossicità osservata, come definito dalla perdita di peso corporeo. Quando la terapia è stata interrotta dopo 11 giorni, i tumori non sono stati rivelati in topi trattati con un programma di dosaggio di 100 mg/kg del composto dell'Esempio 1 e diminuivano al

42% del volume iniziale in topi trattati con un programma di dosaggio di 50 mg/kg. I topi di controllo sono stati sacrificati il giorno 18 dall'inizio della terapia quando il volume medio del tumore era aumentato di oltre il 500%. Al contrario, singoli topi sono stati sacrificati quando i tumori erano progrediti fino a questo stadio, come segue: giorni 28 e 31 a 50 mg/kg e giorni 46 e 56 a 100 mg/kg. Tre topi su 5 in ciascun gruppo di trattamento (60%) non hanno sviluppato tumori progressivamente crescenti al momento della conclusione dello studio il giorno 60.

Come risultato di questo potente effetto inibitorio *in vivo*, i tumori durante il trattamento erano troppo piccoli per fornire materiale per un'analisi farmacocinetica/farmacodinamica. Successivamente, è stato condotto uno studio PK/PD ripetuto di 4 giorni con somministrazione orale di 50 mg/kg e di 100 mg/kg dell'Esempio 1 due volte al giorno. L'analisi farmacodinamica ha mostrato una chiara inibizione della fosforilazione dell'istone H-3 e inibizione della fosforilazione di STAT5, che è un bersaglio a valle di FLT3 (Figura 2). Inoltre, la concentrazione plasmatica del farmaco libero in campioni ottenuti 2 ore dopo la dose finale è stata determinata essere rispettivamente di 222 nM e 488 nM per i programmi di dosaggio di 50 mg/kg e 100 mg/kg (Figura 2). Le concentrazioni plasmatiche del farmaco libero sono chiaramente al di sopra dei valori K_d del composto dell'Esempio 1 contro le chinasi pertinenti, cioè Aurora-A ($K_d = 7,5$ nM), Aurora-B ($K_d = 48$ nM), FLT3 ($K_d = 6,2$ nM), FLT3-ITD ($K_d = 38$ nM). Questi risultati dimostrano che il composto dell'Esempio 1 inibisce significativamente la crescita di un modello di xeno-trapianto umano di AML FLT3-ITD positivo *in vivo*, con modulazione dei biomarcatori ed esposizione al farmaco libero coerenti con il duplice impegno dei bersagli FLT3 e Aurora chinasi.

Inibizione di isoforme del citocromo P450

Materiali e metodi

In questo studio sono stati utilizzati due composti comparatori, vale a dire 6-bromo-2-(1-metil-1*H*-pirazol-4-il)-7-(4-(piridin-3-ilmetil)piperazin-1-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina (Comparatore 1, Esempio 56, WO2007/072017) e 6-bromo-7-(4-(piridin-3-ilmetil)piperazin-1-il)-2-(1,3,5-trimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina (Comparatore 2, Esempio 57, WO2007/072017).

I composti comparatori e i composti degli esempi 1 a 3 di cui sopra sono stati incubati con microsomi epatici umani (0,5 mg.ml⁻¹) a 1µM, 10µM e 50µM.

L'inibizione degli isoenzimi CYP è stata determinata utilizzando una miscela di substrati sonda (Tabella 4). I campioni sono stati incubati per 10 minuti, seguito da precipitazione proteica con metanolo. I metaboliti del substrato in ciascun campione sono stati misurati mediante LC/MS/MS utilizzando la cromatografia liquida in fase inversa ed ESI in modalità di ioni positivi con monitoraggio di reazioni multiple (MRM).

Tabella 4: concentrazioni del substrato sonda di isoenzimi CYP e metaboliti rivelati

Enzima	Substrato sonda	Concentrazione del substrato (µM)	Letteratura Km (µM)	Metabolita
CYP1 A2	Fenacetina	10	10-50	Acetaminofene
CYP2A6	Cumarina	5	0.5-2	7-Idrossicumarina
CYP2C9	Tolbutamide	60	100-200	4-Idrossitolbutamide
CYP2C19	Mefenitoina	40	30-50	(+/-)-Idrossimefenitoina
CYP2D6	Bufuralolo	5	4-10	1-Idrossibufuralolo
CYP3A4	Midazolam	3	3-5	1-Idrossimidazolam

Risultati

Tabella 5: Valori IC₅₀ stimati per l'inibizione di isoenzimi CYP umani da parte dei composti di test

	CYP1 A2	CYP2A6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Comparatore 1	10-50 µM	>50 µM	10-50 µM	10-50 µM	1-10 µM	<1 µM
Comparatore 2	>50 µM	>50 µM	10-50 µM	10-50 µM	10-50 µM	<1 µM
Esempio 1	>50 µM	>50 µM	10-50 µM	10-50 µM	10-50 µM	>50 µM

	CYP1 A2	CYP2A6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4
Esempio 2	>50 μ M	>50 μ M	10-50 μ M	10-50 μ M	10-50 μ M	>50 μ M
Esempio 3	>50 μ M	>50 μ M	10-50 μ M	>50 μ M	10-50 μ M	>50 μ M

Gli esempi 1-3 non hanno mostrato alcuna inibizione significativa degli isoenzimi CYP (Tabella 5), i valori IC_{50} stimati erano superiori a 10 μ M.

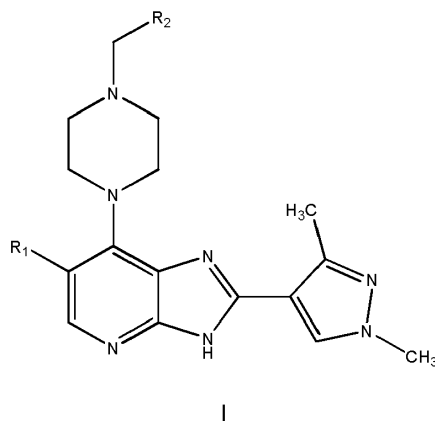
Nessun composto ha mostrato una significativa inibizione di CYP1A2, CYP2A6, CYP2C9 o CYP2C19. Entrambi i composti comparatori hanno mostrato un'inibizione significativa di CYP3A4 con IC_{50} approssimative inferiori a 1 μ M, il Comparatore 1 inibendo anche CYP2D6. I composti della presente invenzione pertanto mostravano un'inibizione di CYP3A4 significativamente ridotta rispetto a entrambi i composti comparatori.

Bibliografia

1. Carmena, M *et al.*; *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2003**, *4*, 842-854.
2. Ducat D. *et al.*; *Exp. Cell Res.* **2004**, *301*, 60-67.
3. Marumoto, T. *et al.*; *Nat. Rev. Cancer* **2005**, *5*, 42-50.
4. Barr, A. R. *et al.* *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 2987-2996.
5. Bayliss, R *et al.*; *Mol. Cell.* **2003**, *12*, 851-862.
6. Giet, R. *et al.*; *J. Cell Biol.* **2001**, *152*, 669- 681.
7. Gassmann, R. *et al.*; *J. Cell Biol.* **2004**, *166*, 179 - 191.
8. Sessa, F. *et al.*; *Mol. Cell*, **2005**, *18*, 379-391.
9. Bishop, J. D. *et al.*; *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 27577-27580.
10. Tanaka, T. *et al.*; *Cancer Res.* **1999**, *59*, 2041-2044.
11. Bischoff, J. R. *et al.*; *EMBO J.* **1998**, *17*, 3052-3065.
12. Gritsko, T. M. *et al.*; *Clin. Cancer. Res.* **2003**, *9*, 1420-1426.
13. Reichardt, W. *et al.*; *Oncol. Rep.* **2003**, *10*, 1275-1279.
14. Chieffi, P. *et al.*; *J. Endocrinol.* **2004**, *181*, 263-270.
15. Araki, K. *et al.*; *J Neurooncol.* **2004**, *67*, 53-64.
16. Sorrentino, R. *et al.*; *J Clin Endocrinol Metab.* **2005**, *90*, 928-935.
17. Kimura, M. *et al.*; *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 7334-7340.
18. Pollard, J. R. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2009**, *52*, 2629-2651.
19. Green, M. R. *et al.*; *Expert Opin. Drug Discov.* **2011**, *6*, 291-307.
20. Cheung, C. H. A. *et al.*; *Expert Opin. Ther. Patents* **2011**, *21*, 857-884.
21. Harrington, E. A. *et al.*; *Nat. Med.* **2004**, *10*, 262-267.
22. Mortlock, A. A. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2007**, *50*, 2213-2224.
23. Fancelli, D. *et al.*; *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 7247-7251.
24. Caprinelli, P. *et al.*; *Mol. Cancer Ther.* **2007**, *6*, 3158-3168.
25. Payton, M. *et al.*; *Cancer Res* **2010**, *70*, 9846-9854.
26. Bavetsias, V. *et al.*; *J. Med Chem.* **2010**, *53*, 5213-5228.
27. CLogP was calculated using ChemBioDraw Ultra 12 by CambridgeSoft (www.cambridgesoft.com).
28. Kinase profiling using the KINOMEScan™ technology: www.kinomescan.com.
29. Manfredi, M. G. *et al.*; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2007**, *104*, 4106-4111.
30. Ikezoe, T. *et al.*; *Mol Cancer Ther* **2007**, *6*, 1851-1857.
31. Ochi, T. *et al.*; *Blood* **2009**, *113*, 66-74.
32. Huang, X.-F. *et al.*; *Blood* **2008**, *111*, 2854-2865.
33. Walsby, E. *et al.*; *Haematologica* **2008**, *93*, 662-669.
34. Meshinchi, S. *et al.*; *Clin Cancer Res* **2009**, *15*, 4263-4269.
35. Meshinchi, S. *et al.*; *Blood* **2006**, *108*, 3654-3661.
36. Chan, F. *et al.*; *Mol Cancer Ther.* **2007**, *6*, 3147-3157.
37. Stirewalt, D. L. *et al.*; *Nat Rev Cancer* **2003**, *3*, 650-665.
38. Kindler, T. *et al.*; *Blood* **2010**, *116*, 5089 – 5102.
39. Levis, M. J.; *Best Practice & Research Clinical Haematology* **2010**, *23*, 489-494.
40. Bavetsias, V. *et al.*; *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17*, 6567-6571.
41. *Ion Channel Cardiac Profiler*; Millipore: Billerica, MA:
http://www.millipore.com/life_sciences/flx4/ld_ion
42. hERG Safety Assay; Cyprotex plc, Cheshire, UK; www.cyprotex.com
43. Roden, D. M. *N. Engl. J. Med.* **2004**, *350*, 1013-1022.

RIVENDICAZIONI

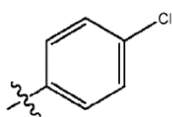
1. Composto di formula I mostrato sotto:



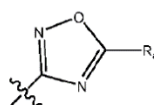
in cui:

R_1 è Br o Cl;

R_2 è scelto dalla formula II o dalla formula III mostrate sotto:



II



III

in cui R_a è idrogeno o metile;

o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

2. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R_1 è Cl.
3. Composto secondo la rivendicazione 1, in cui R_1 è Br.
4. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, in cui R_2 è di formula II.
5. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 3, in cui R_2 è di formula III.
6. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni precedenti, che è scelto tra uno qualsiasi di:

6-Cloro-7-(4-(4-clorobenzil)piperazin-1-il)-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridina;

3-((4-(6-Cloro-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-7-il)piperazin-1-il)metil)-

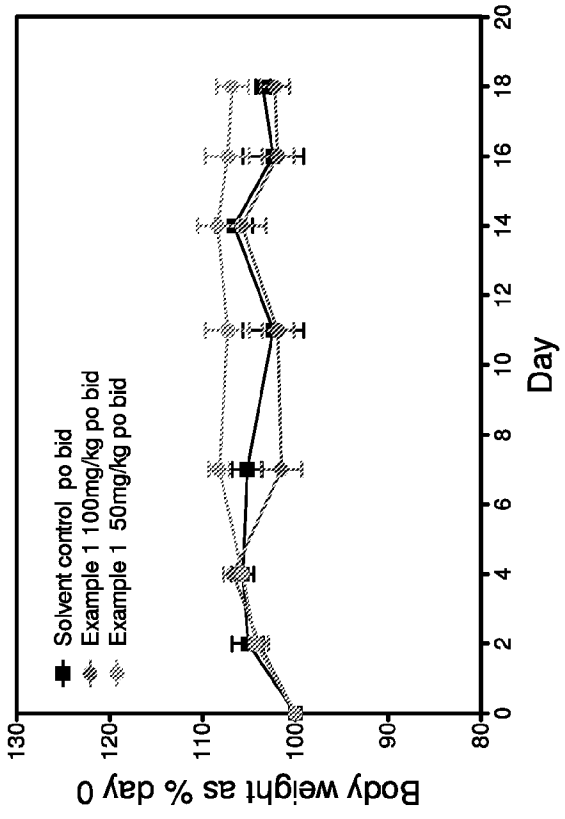
1,2,4-ossadiazolo;

3-((4-(6-Cloro-2-(1,3-dimetil-1*H*-pirazol-4-il)-3*H*-imidazo[4,5-*b*]piridin-7-il)piperazin-1-il)metil)-5-

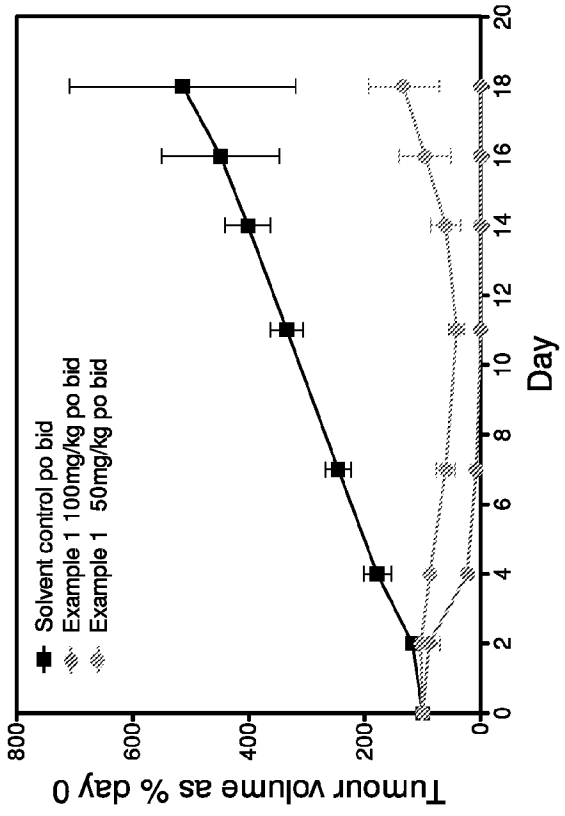
metil-1,2,4-ossadiazolo;

o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

7. Composizione farmaceutica comprendente un composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, e uno o più eccipienti farmaceuticamente accettabili.
8. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, per utilizzo nella terapia.
9. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 a 6, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, per utilizzo nel trattamento di un disturbo proliferativo, quale un cancro.
10. Composto per utilizzo secondo la rivendicazione 9, o un suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile, in cui il disturbo proliferativo è la leucemia mieloide acuta.

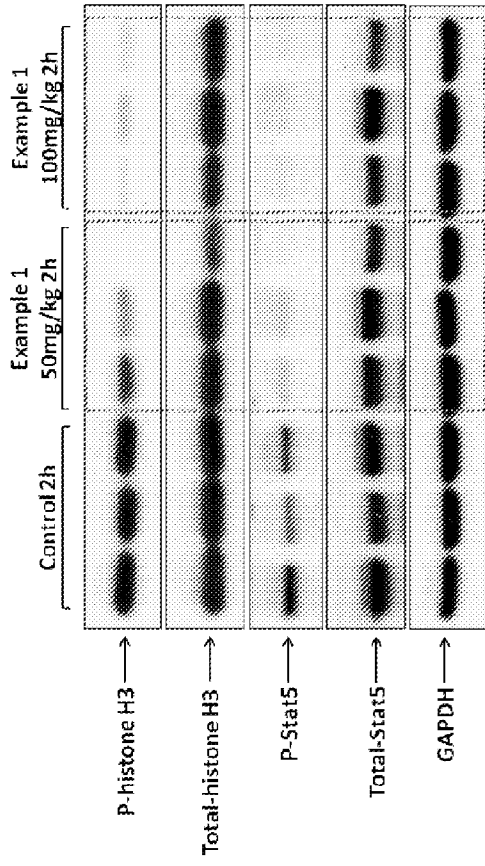


(A)

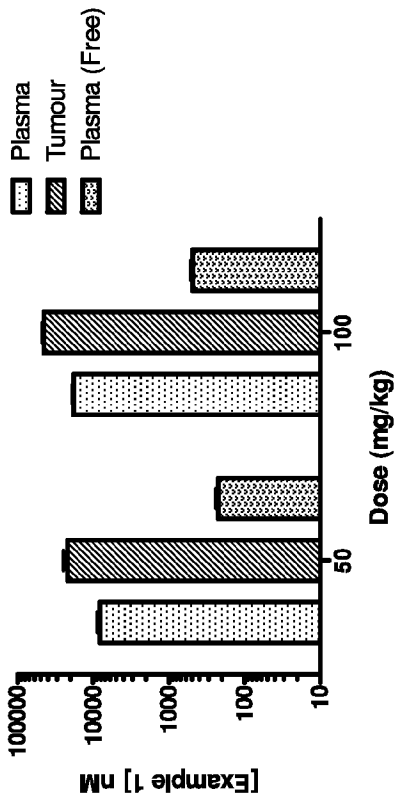


(B)

Figure 1



(B)



(A)

Figure 2