

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3181567

DAL TITOLO:

"COMPOSTI DI PIRAZOLOPIRIMIDINA COME INIBITORI DI CHINASI"

*** .. *** .. ***

Descrizione

La presente invenzione fornisce alcuni composti a piccola molecola che sono inibitori di tirosin chinasi, in particolare inibitori di tirosin chinasi di Bruton (BTK), e sono perciò utili per il trattamento di malattie trattabili mediante l'inibizione di tirosin chinasi, quali cancro e malattie infiammatorie. Sono inoltre fornite alcune composizioni farmaceutiche contenenti tali composti e processi per preparare tali composti.

Il genoma umano contiene almeno 500 geni codificanti protein chinasi. Molte di queste chinasi sono state implicate in malattia umana e per questo rappresentano bersagli terapeutici potenzialmente interessanti. La BTK, un membro delle tirosin chinasi non recettoriali della famiglia Tec, è essenziale per la trasduzione di segnale delle cellule B a valle del recettore delle cellule B. Essa è espressa nelle cellule B e in altre cellule ematopoietiche come monociti, macrofagi e mastociti. Viene riportato che la BTK agisce su vari aspetti funzionali delle cellule B che mantengono il repertorio delle cellule B (si veda Gauld S. B. et al., B cell antigen receptor signaling: roles in cell development and disease. Science, 296:1641-2. 2002.)). La convalida clinica del ruolo delle cellule B nell'artrite reumatoide è stata fornita

dall'efficacia del biologico Rituxan (un anticorpo anti-CD20), che, come meccanismo d'azione, causa deplezione delle cellule B (si veda Perosa F., et al., CD20-depleting therapy in autoimmune diseases: from basic research to the clinic. *J Intern Med.* 267:260-77. 2010 e Dörner T, et al. Targeting B cells in immune-mediated inflammatory disease: a comprehensive review of mechanisms of action and identification of biomarkers. *Pharmacol Ther.* 125:464-75. 2010.). È riportato che la BTK è richiesta per lo sviluppo delle cellule B poiché pazienti affetti dalla malattia agammaglobulinemia legata al cromosoma X (si veda Rosen F. S., et al., The primary immunodeficiencies. *N Engl J Med.* 333:431-40. 1995) sono privi anticorpi nel loro torrente sanguigno. In particolare è stato riportato che inibitori di BTK a piccola molecola in sviluppo preclinico sono efficaci nell'artrite indotta da collagene (si veda Pan Z., et al., Discovery of selective irreversible inhibitors for Bruton's tyrosine kinase. *J. Med. Chem.* 2:58-61. 2007). Il potenziale vantaggio di un inibitore di BTK a piccola molecola (oltre al vantaggio intrinseco di una piccola molecola rispetto ad un biologico) è costituito dal fatto che la modulazione di BTK può inibire la funzione delle cellule B senza rimozione permanente della cellula B stessa. Pertanto i lunghi periodi di bassi livelli di cellule B che si presentano con il biologico Rituxan dovrebbero essere evitabili colpendo la BTK con un inibitore di BTK a piccola molecola.

Inoltre ci si aspetta che le attività modificanti la malattia di BTK si estendano oltre quelle di Rituxan a causa di effetti su ulteriori bersagli

cellulari che sono coinvolti nella propagazione della malattia. Ad esempio è riportato che la degranolazione dei mastociti indotta da antigene è ridotta in mastociti derivati dal midollo osseo di topi con deficienza di BTK, dimostrando che la BTK è a valle del recettore Fc ϵ R1 (si veda Setoguchi R., et al., Defective degranulation and calcium mobilization of bone-marrow derived mast cells from Xid and BTK-deficient mice. *Immunol Lett.* 64:109-18. 1998). Un modulo di trasduzione del segnale simile esiste in monociti e macrofagi per il recettore Fc γ R1, indicando che è molto probabile che l'inibizione di BTK moduli la produzione di TNF in risposta alla IgG. Si ritiene che sia i mastociti che i macrofagi contribuiscano alla propagazione dell'ambiente citochinico infiammatorio del sinovio malato.

Oltre agli effetti periferici e sinoviali dell'inibizione di BTK sopra descritti, è riportato che l'inibizione di BTK avrebbe effetti protettivi sulle ossa in un'articolazione infiammata (si veda Gravallesse E. M., et al., Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.* 43:250-8. 2000). È riportato che studi su topi con deficienza di BTK oppure con funzionalità di BTK ridotta hanno dimostrato che la differenziazione di rango di osteoclasti indotta da ligando è ridotta in assenza di funzionalità di BTK (si veda Lee S. H., et. al., The tec family tyrosine kinase BTK Regulates RANKL-induced osteoclast maturation. *J. Biol. Chem.* 283:11526-34. 2008). Si può ritenere che questi studi nel loro insieme suggeriscono che un inibitore di BTK potrebbe inibire o invertire la distruzione ossea che si

verifica nei pazienti affetti da artrite reumatoide. Data l'importanza delle cellule B nella malattia autoimmune, gli inibitori di BTK potrebbero anche essere utili in altre malattie autoimmuni come il lupus eritematoso sistemico (si veda Shlomchik M. J., et. al., The role of B cells in lpr/lpr-induced autoimmunity. J. Exp Med. 180:1295-1306. 1994). In particolare è stato riferito che un inibitore irreversibile di BTK mostra efficacia nel modello di lupus MRL/lpr nel topo, riducendo la produzione di anticorpi e il danno renale (si veda Honigberg L. A., The Bruton tyrosine kinase inhibitor PCI-32765 blocks B-cell activation and is efficacious in models of autoimmune disease and B-cell malignancy. Proc. Natl. Acad. Sci. 107:13075-80. 2010).

Gli inibitori di BTK hanno anche del potenziale relativamente al trattamento delle malattie allergiche (si veda Honigberg, L., et. al., The selective BTK inhibitor PCI-32765 blocks B cell and mast cell activation and prevents mouse collagen induced arthritis. Clin. Immunol. 127 S1:S111. 2008). Inoltre è riportato che l'inibitore irreversibile sopprime l'anafilassi cutanea passiva (PCA) indotta dal complesso dell'antigene IgE nei topi (si veda Honigberg, L., et. al., The selective BTK inhibitor PCI-32765 blocks B cell and mast cell activation and prevents mouse collagen induced arthritis. Clin. Immunol. 127 S1:S111. 2008). Questi trovati che sono stati riportati sono in accordo con quelli osservati con mastociti con BTK mutante e topi knockout e si può ritenere che suggeriscano che gli inibitori di BTK possono essere utili per il

trattamento dell'asma, di una malattia allergica dipendente da IgE delle vie respiratorie.

Inoltre è riportato che l'aggregazione piastrinica in risposta a peptide di collagene o correlato a collagene è ridotta in pazienti XLA che sono privi della funzionalità di BTK (si veda Quek L. S, et al., A role for Bruton's tyrosine kinase (BTK) in platelet activation by collagen. *Curr. Biol.* 8:1137-40.1998). Ciò è manifestato da cambiamenti a valle di GPIV, come la fosforilazione di PLCgamma2 e il flusso di calcio, che si possono ritenere suggerire una potenziale utilità nel trattamento delle malattie tromboemboliche.

È riportato che studi preclinici con un inibitore selettivo di BTK hanno mostrato effetti su linfomi a cellule B canini spontanei, suggerendo una potenziale utilità nei linfomi umani o in altre neoplasie ematologiche maligne, inclusa la leucemia linfatica cronica. Si possono inoltre interpretare studi clinici con PCI-32765 come indicativi di utilità di un inibitore di BTK sia nella leucemia linfatica cronica che nel linfoma mantellare (si veda Fowler, N et al., The Btk inhibitor, PCI-32765, induces durable responses with minimal toxicity in patients with relapsed/refractory Bcell malignancies: results from a phase I study. *Blood* 2010;116 (21) :425; Byrd J. C., et al. Activity and tolerability of the Bruton's tyrosine kinase (Btk) inhibitor PCI-32765 in patients with chronic lymphocytic leukemia/small lymphocytic lymphoma (CLL/SLL): Interim results of a phase Ib/II study. *J Clin Oncol* 2011;29 :6508).

È riportato che ITK, un membro della famiglia di chinasi TEC è coinvolta nell'attivazione delle cellule T e dei mastociti (si veda Iyer A. S. et al.. L'assenza di chinasi della famiglia Tec, chinasi delle cellule T inducibile da interleuchina-2 (Itk) e tirosin chinasi di Bruton (Btk) riduce in modo grave le risposte Fc{epsilon}RI-dipendenti dei mastociti. *J. Biol Chem.*; 286:9503-13. 2011) e costituisce un potenziale bersaglio nelle malattie immunitarie infiammatorie come l'asma. È riportato che topi con deficienza di ITK sono resistenti allo sviluppo dell'asma allergico (si veda Sahu N, et al., Differential sensitivity to Itk kinase signals for T helper 2 cytokine production and chemokine-mediated migration. *J. Immunol.* 180:3833-8. 2008). È riportato che un altro membro della famiglia, BMX, è coinvolto nel sostegno all'angiogenesi tumorale mediante il suo ruolo nell'endotelio vascolare tumorale (si veda Tu T, et al., Bone marrow X kinase-mediated signal transduction in irradiated vascular endothelium. *Cancer Res.* 68:2861-9. 2008) e viene anche progressivamente up-regolato durante la progressione del cancro alla vescica (si veda Guo S., et al., Tyrosine Kinase ETK/BMX Is Up-Regulated in Bladder Cancer and Predicts Poor Prognosis in Patients with Cystectomy. *PLoS One.* 6:e17778. 2011), cosa che può essere interpretata come suggerire un potenziale bersaglio terapeutico in questo tipo di cancro. È riportato che la chinasi B linfocitica (nel seguito di questo documento talvolta chiamata "BLK") è legata attraverso associazione genetica a varie malattie reumatiche incluso il lupus eritematoso sistemico e la sclerosi sistemica (si veda Ito I, et al.,

Association of the FAM167A-BLK region with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 62:890-5. 2010).

Conseguentemente esiste la necessità di composti che inibiscano le tirosin chinasi, e in particolare di inibitori di BTK, fornendo in tal modo un trattamento per malattie come le malattie autoimmuni, le malattie infiammatorie, le malattie tromboemboliche e il cancro. La presente divulgazione è diretta a tale trattamento.

La presente invenzione fornisce un composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile, dove il composto è scelto tra:

(R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile;

(S)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile;

2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((R)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

2-((S)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((R)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((S)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

2-((S)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((S)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

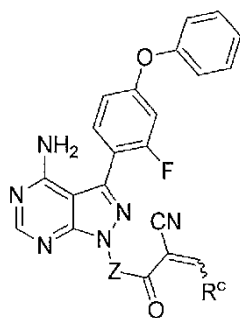
(R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(5,6-diidroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)-4-metilpent-2-ennitrile; e

(S)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(5,6-diidroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)-4-metilpent-2-ennitrile,

o una miscela di loro isomeri R e S; oppure

un isomer (E) o (Z) di uno qualsiasi dei precedenti composti.

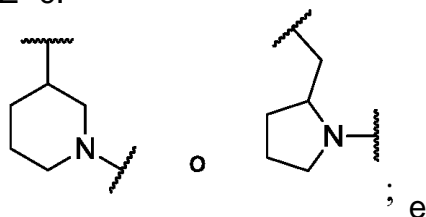
I precedenti composti sono coperti dalla formula generale (IA):



(IA)

dove:

-Z- è:



R^c è:

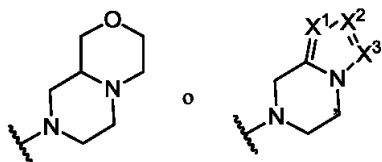
(a) -C(CH₃)₂-(4-R⁴-piperazin-1-ile) dove R⁴ è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile, alchilsolfonile, alcossicarbonile, acile, o

ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(b) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(3-osso-4-R}^a\text{-piperazin-1-ile)}$ dove R^a è idrogeno, alchile, cicloalchile, alcossialchile, aloalchile od ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(c) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-NR}^b\text{ossetan-3-ile}$ dove R^b è idrogeno, alchile, alcossialchile o cicloalchile;

(d) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-R}^c$ dove R^c è



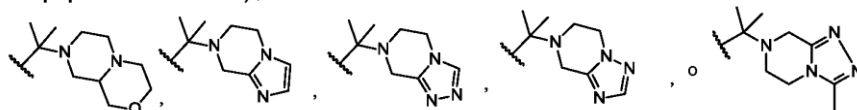
dove uno o due di X^1 , X^2 e X^3 sono azoto e il resto sono carbonio e l'anello è facoltativamente sostituito con uno o due sostituenti indipendentemente selezionati tra alchile, aloalchile, o alogeno; oppure

(e) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile}$, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2\text{morfolin-4-ile}$;

e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Nella formula (IA) R^c può essere $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(piperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-metilpiperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-etilpiperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-N}(\text{ciclopropil})\text{-ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-NHossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-2-ossa-6-azaspiro-[3.3]eptan-6-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2\text{morfolin-4-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-metilsolfonil-piperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(3-osso-4-}$

metilpiperazin-1-ile), $-C(CH_3)_2$ -[4-(2-metossietil)-piperazin-1-ile], $-C(CH_3)_2$ -[4-(2,2,2-trifluoroetil)-piperazin-1-ile], $-C(CH_3)_2$ -[4-(2,5-dimetil-piperazin-1-ile)], $-C(CH_3)_2$ -[4-(3,5-dimetilpiperazin-1-ile)], $-C(CH_3)_2$ -[4-(3,4,5-trimetilpiperazin-1-ile)], $-C(CH_3)_2$ -[4-(2,4,5-trimetilpiperazin-1-ile)], $-C(CH_3)_2$ -[4-(ossetan-3-il)piperazin-1-ile], $-C(CH_3)_2$ -[4-(metossicarbonilpiperazin-1-ile)], $-C(CH_3)_2$ -[4-(3,5-dimetilpiperazin-1-ile)],



In un'altra forma di realizzazione il composto è scelto tra (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile; o un suo singolo isomero E o Z; e/o un sale farmaceuticamente accettabile di qualsiasi dei precedenti composti.

In un'altra forma di realizzazione il composto è scelto tra (S)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile; o un suo singolo isomero E o Z; e/o un sale farmaceuticamente accettabile di qualsiasi dei precedenti composti.

In una forma di realizzazione i composti della presente divulgazione sono inibitori covalenti reversibili.

In un'altra forma di realizzazione i composti della presente divulgazione formano un legame covalente reversibile con Cys 481 di BTK.

La presente invenzione fornisce anche una composizione farmaceutica comprendente un composto e/o un sale farmaceutico di qualsiasi forma di realizzazione qui divulgata e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

La presente invenzione fornisce anche un composto secondo l'invenzione e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso nel trattamento di una malattia scelta tra malattie autoimmuni, malattie o condizioni eteroimmuni, malattie infiammatorie e cancro.

I composti dell'invenzione sono tipicamente per l'uso in un metodo di trattamento di una malattia trattabile mediante inibizione di una tirosin chinasi quali BLK, BMX, HER2, HER4, ITK, TEC, BTK, e TXK, come BTK, in un paziente che ha bisogno di tale trattamento, metodo che comprende la somministrazione al paziente che ne ha riconosciuto bisogno, di una composizione farmaceutica comprendente un composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile di qualsiasi forma di realizzazione qui divulgata e un eccipiente farmacologicamente accettabile in una quantità efficace per ottenere il trattamento (quantità terapeutica). In una forma di organizzazione il paziente ha un bisogno riconosciuto di tale trattamento. In una forma di realizzazione la malattia è scelta tra malattie autoimmuni, malattie infiammatorie e cancro.

In un aspetto della precedente forma di realizzazione, il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da una malattia autoimmune, ad esempio malattia infiammatoria intestinale come colite ulcerosa, artrite, lupus, artrite reumatoide, artrite psoriasica, osteoartrite, malattia di Still, artrite giovanile, diabete, miastenia gravis, tiroidite di Hashimoto, tiroidite di Ord, malattia di Graves, sindrome di Sjogren, occhio secco di Sjogren, malattia dell'occhio secco non Sjogren, sclerosi multipla, sindrome di Guillain-Barre, encefalomielite acuta disseminata, malattia di Addison, sindrome dell'opsoclonomioclonio, spondilite anchilosante, sindrome da anticorpi antifosfolipidi, anemia aplastica, epatite autoimmune, celiachia, sindrome di Goodpasture, porpora trombocitopenica idiopatica, neurite ottica, sclerodermia, cirrosi biliare primitiva, sindrome di Reiter, arterite di Takayasu, arterite temporale, anemia emolitica autoimmune da anticorpi caldi, granulomatosi di Wegener, psoriasi, alopecia universalis, sindrome di Behcet, stanchezza cronica, disautonomia, endometriosi, cistite interstiziale, neuromiotonia, sclerodermia, e vulvodinia. In una forma di realizzazione la malattia è l'artrite reumatoide o l'artrite psoriasica. In un'altra forma di realizzazione la malattia autoimmune è il lupus.

In ancora una forma di realizzazione qui divulgata, il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da una malattia o condizione eteroimmune, ad esempio malattia del trapianto verso

l'ospite, trapianto, trasfusione, anafilassi, allergia, ipersensibilità di tipo I, congiuntivite allergica, rinite allergica e dermatite atopica.

In ancora un'altra forma di realizzazione qui divulgata, il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da una malattia infiammatoria ad esempio asma, appendicite, blefarite, bronchiolite, bronchite, borsite, cervicite, colangite, colecistite, colite, congiuntivite, cistite, dacrioadenite, dermatite, dermatomiosite, encefalite, endocardite, endometrite, enterite, enterocolite, epicondilite, epididimite, fascite, fibrosite, gastrite, gastroenterite, epatite, idrosadenite suppurativa, laringite, mastite, meningite, mielite, miocardite, miosite, nefrite, ooforite, orchite, osteite, otite, pancreatite, parotite, pericardite, peritonite, faringite, pleurite, flebite, infiammazione polmonare, polmonite, proctite, prostatite, pielonefrite, rinite, salpingite, sinusite, stomatite, sinovite, tendinite, tonsillite, uveite, vaginite, vasculite, o vulvite, come asma. In ancora un'altra forma di realizzazione qui divulgata il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da malattia cutanea infiammatoria come dermatite, dermatite da contatto, eczema, orticaria, rosacea, e lesioni psoriasiche cicatriziali di cute, articolazioni o altri tessuti od organi.

In ancora un'altra forma di realizzazione qui divulgata il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da un cancro. In una forma di realizzazione il cancro è un disturbo proliferativo delle cellule B, ad esempio linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma follicolare, linfoma linfocitico cronico, leucemia linfatica cronica,

leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL), leucemia prolinfocitica a cellule B, piccolo linfoma linfocitico (SLL), mieloma multiplo, linfoma a cellule B non Hodgkin, linfoma linfoplasmocitico/macroglobulinemia di Waldenstrom, linfoma splenico della zona marginale, mieloma delle plasmacellule, plasmocitoma, linfoma a cellule B della zona marginale extranodale, linfoma a cellule B della zona marginale nodale, linfoma mantellare, linfoma a grandi cellule B mediastinico (timico), linfoma a grandi cellule B intravascolare, linfoma primitivo effusivo, leucemia/linfoma di Burkitt, e granulomatosi linfomatoide.

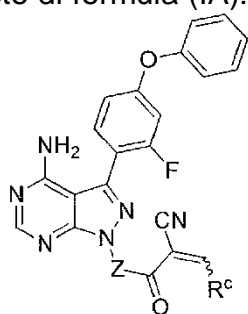
In ancora un'altra forma di realizzazione il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da un disturbo tromboembolico, ad esempio infarto del miocardio, angina pectoris, riuclusione dopo angioplastica, restenosi dopo angioplastica, riuclusione dopo bypass aortocoronarico, restenosi dopo bypass aortocoronarico, ictus, ischemia transitoria, un disturbo occlusivo arterioso periferico, embolismo polmonare e trombosi venosa profonda.

La divulgazione è anche rivolta a qualsiasi composto e/o suo farmaceutico divulgato nella presente per l'uso come medicinale. In una forma di realizzazione i composti e/o il loro sale farmaceuticamente accettabile divulgati nella presente sono per l'uso nel trattamento di una malattia mediata da una chinasi, in particolare BTK, per trattare una malattia scelta tra malattie autoimmuni e infiammatorie, e malattie proliferative come i cancro.

In qualsiasi delle summenzionate forme di realizzazione divulgate nella presente che coinvolgono il trattamento di malattie proliferative, incluso il cancro, può anche essere implicata la politerapia, ossia i composti e/o un sale farmaceuticamente accettabile qui divulgati possono essere somministrati in combinazione con almeno un agente antiproliferativo e/o anticancro aggiuntivo. In una forma di realizzazione l'almeno un agente aggiuntivo è scelto tra alemtuzumab, triossido di arsenico, asparaginasi (pegilata o non), bevacizumab, cetuximab, composti a base di platino come cisplatino, cladribina, daunorubicina/doxorubicina/idarubicina, irinotecan, fludarabina, 5-fluorouracile, gemtuzamab, metotrexato, paclitaxel, Taxol™, docetaxel, temozolomide, tioguanina, e classi di farmaci che includono ormoni (un antiestrogeno, un antiandrogeno, o analoghi dell'ormone di rilascio delle gonadotropine, interferoni come interferone alfa, mostarde azotate come busulfano o melfalan o mecloretamina, retinoidi come tretinoina, inibitori della topoisomerasi come irinotecan o topotecan, inibitori di tirosin chinasi come gefinitinib o imatinib, ofatumumab, bendamustina, rituximab, obinutuzumab, IPI-145, GS-1101, BKM-120, GDC-0941, DGDC-0980, GS-9820, CAL-263, Revlimid®, thalidomide®, pomalidomide®, Velcade®, Kyprolis®, delanzomib, U0126, PD98059, PD184352, PD0325901, ARRY-142886, SB239063, SP600125, BAY 43-9006, wortmannina, Nexavar®, Tarceva®, Sutent®, Tykerb®, Sprycel®, Crizotinib, Xalkori®, o LY294002 o agenti per il trattamento di segni o sintomi indotti da tale terapia, inclusi allopurinolo, filgrastim,

granisetron/ondansetron/ palonosetron, dronabinol. Quando è utilizzata la politerapia gli agenti possono essere somministrati simultaneamente o sequenzialmente.

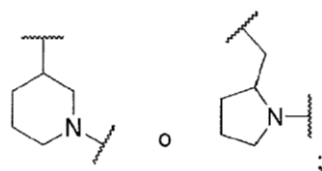
É qui anche divulgato un processo per la preparazione di un composto di formula (IA):



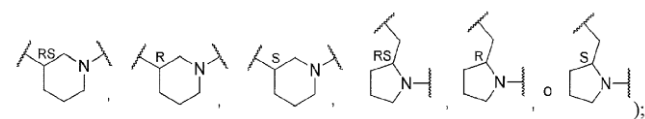
(IA)

dove:

-Z- è:



(per esempio,



e

R^c è:

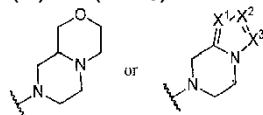
(a) -C(CH₃)₂-(4-R⁴-piperazin-1-ile) dove R⁴ è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile, alchilsolfonile, alcossicarbonile, acile, o

ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(b) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(3\text{-osso-4-}\text{R}^a\text{-piperazin-1-ile})$ dove R^a è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile od ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(c) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NR}^b$ ossetan-3-ile dove R^b è idrogeno, alchile, o cicloalchile;

(d) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{R}^c$ dove R^c è



"or" = o

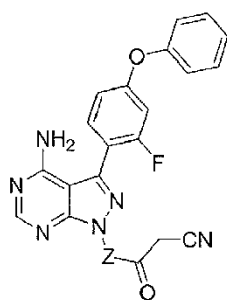
dove uno o due di X^1 , X^2 e X^3 sono azoto e il resto sono carbonio e l'anello è facoltativamente sostituito con uno o due sostituenti indipendentemente selezionati tra alchile, aloalchile, o alogeno; oppure

(e) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-2\text{-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile}$, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{CH}_2\text{morfolin-4-ile}$; ((in una forma di realizzazione R^c è $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ (piperazin-1-ile), $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(4\text{-metilpiperazin-1-ile})$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(4\text{-etilpiperazin-1-ile})$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{N}(\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-\text{NHossetan-3-ile}$, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-2\text{-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile}$); e/o

un loro sale farmaceuticamente accettabile;

comprendente:

(a) far reagire un composto di formula (1):



(1)

dove:

-Z- è come sopra definito;

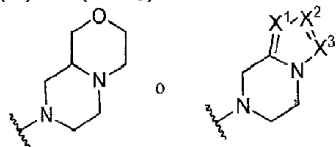
con un'aldeide di formula R^cCHO dove R^c è:

(a) $-C(CH_3)_2-(4-R^4\text{-piperazin-1-ile})$ dove R^4 è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile, alchilsolfonile, alcossicarbonile, acile, o ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(b) $-C(CH_3)_2-(3\text{-osso-4-}R^a\text{-piperazin-1-ile})$ dove R^a è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile od ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(c) $-C(CH_3)_2-NR^b\text{ossetan-3-ile}$ dove R^b è idrogeno, alchile, o cicloalchile;

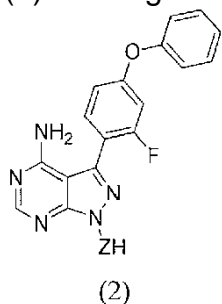
(d) $-C(CH_3)_2-R^c$ dove R^c è



dove uno o due di X^1 , X^2 e X^3 sono azoto e il resto sono carbonio e l'anello è facoltativamente sostituito con uno o due sostituenti indipendentemente selezionati tra alchile, aloalchile, o alogeno; oppure

(e) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ - CH_2 morfolin-4-ile; (in una forma di realizzazione R^c è $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -piperazin-1-ile), $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -(4-metilpiperazin-1-ile), $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -(4-etilpiperazin-1-ile), $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -N(CH₃)ossetan-3-ile, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -N(CH₂CH₃)ossetan-3-ile, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -NHossetan-3-ile, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile); oppure

(b) far reagire un composto di formula (2):



dove:

-Z- è come sopra definito;

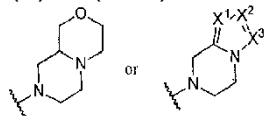
con un composto di formula $\text{R}^c\text{CH}=\text{C}(\text{CN})\text{CO}_2\text{H}$ o $\text{R}^c\text{CH}=\text{C}(\text{CN})\text{COX}$ dove R^c è:

(a) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -(4- R^4 -piperazin-1-ile) dove R^4 è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile, alchilsolfonile, alcossicarbonile, acile, o ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(b) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -(3-osso-4- R^a -piperazin-1-ile) dove R^a è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile od ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(c) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -NR^bossetan-3-ile dove R^b è idrogeno, alchile, o cicloalchile;

(d) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-R}^c$ dove R^c è



"or" = o

dove uno o due di X^1 , X^2 e X^3 sono azoto e il resto sono carbonio e l'anello è facoltativamente sostituito con uno o due sostituenti indipendentemente selezionati tra alchile, aloalchile, o alogeno; oppure

(e) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ - CH_2 morfolin-4-ile; (in una forma di realizzazione R^c è $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -(piperazin-1-ile), $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -(4-metilpiperazin-1-ile), $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -(4-etilpiperazin-1-ile), $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -N(CH₃)ossetan-3-ile, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -N(CH₂CH₃)ossetan-3-ile, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -NHossetan-3-ile, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2$ -2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile);

dove X è un gruppo uscente capace di essere spostato dall'atomo di azoto del gruppo Z in condizioni di reazione di accoppiamento amidico;

(c) facoltativamente realizzare un sale di addizione acida di un composto ottenuto dalle precedenti fasi (a) o (b);

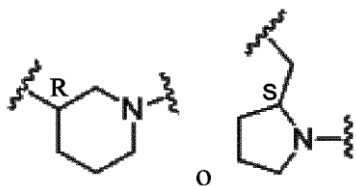
(d) facoltativamente realizzare una base libera di un composto ottenuto dalle precedenti fasi (a), (b), o (c);

(e) facoltativamente separare singoli stereoisomeri dei composti ottenuti dalle precedenti fasi (a), (b), (c), o (d); e

(f) facoltativamente separare singoli isomeri (E) e (Z) dei composti ottenuti dalle precedenti fasi (a), (b), (c), (d), o (e).

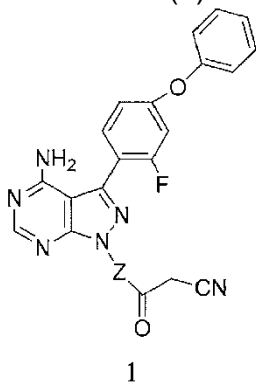
In ancora un'altra forma di realizzazione del processo divulgato,

Z è



e R^c è -C(CH₃)₂-4-(ossetan-3-il)-(piperazin-1-ile).

In un'altra forma di realizzazione del processo divulgato il composto di formula (IA) (e sue forme di realizzazione) è preparato mediante il metodo (a) facendo reagire un composto di formula (1):



dove:

-Z- è come sopra definito;

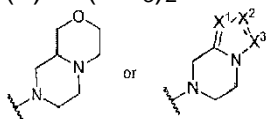
con un'aldeide di formula R^cCHO dove R^c è:

(a) -C(CH₃)₂-(4-R⁴-piperazin-1-ile) dove R⁴ è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile, alchilsolfonile, alcossicarbonile, acile, o ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(b) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(3-osso-4-R}^a\text{-piperazin-1-ile)}$ dove R^a è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile od ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(c) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-NR}^b\text{ossetan-3-ile}$ dove R^b è idrogeno, alchile, o cicloalchile;

(d) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-R}^c$ dove R^c è



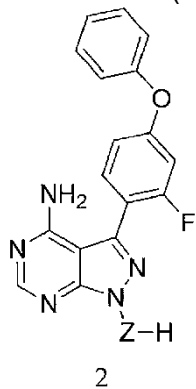
"or" = o

dove uno o due di X^1 , X^2 e X^3 sono azoto e il resto sono carbonio e l'anello è facoltativamente sostituito con uno o due sostituenti indipendentemente selezionati tra alchile, aloalchile, o alogeno; oppure

(e) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile}$, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-CH}_2\text{morfolin-4-ile}$; (in una forma di realizzazione R^c è $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(piperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-metilpiperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-etilpiperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-NHossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-metil-3-ossopiperazin-1-ile)}$, o $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-(2-etossietil)-piperazin-1-ile)}$, come $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(piperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-metilpiperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-(4-etilpiperazin-1-ile)}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-N}(\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-N}(\text{CH}_2\text{CH}_3)\text{ossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-NHossetan-3-ile}$, $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile}$);

in presenza di pirrolidina e trimetilsilil cloruro.

In un'altra forma di realizzazione del processo divulgato, il composto di formula (IA) (e sue forme di realizzazione) è preparato mediante il metodo (b) facendo reagire un composto di formula (2):



dove:

-Z- è come sopra definito;

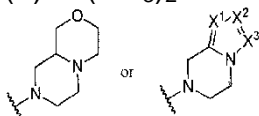
con un composto di formula $R^c\text{CH}=\text{C}(\text{CN})\text{COOH}$ o $R^c\text{CH}=\text{C}(\text{CN})\text{COX}$ dove R^c è:

(a) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(4\text{-R}^4\text{-piperazin-1-ile})$ dove R^4 è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile, alchilsolfonile, alcossicarbonile, acile, o ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(b) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-(3\text{-osso-4-R}^a\text{-piperazin-1-ile})$ dove R^a è idrogeno, alchile, alcossialchile, aloalchile od ossetan-3-ile e l'anello piperazinilico è inoltre facoltativamente sostituito con uno o due alchili;

(c) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-NR}^b\text{ossetan-3-ile}$ dove R^b è idrogeno, alchile, o cicloalchile;

(d) $-\text{C}(\text{CH}_3)_2\text{-R}^c$ dove R^c è



"or" = o

dove uno o due di X^1 , X^2 e X^3 sono azoto e il resto sono carbonio e l'anello è facoltativamente sostituito con uno o due sostituenti indipendentemente selezionati tra alchile, aloalchile, o alo; oppure

(e) $-C(CH_3)_2$ -2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile, o $-C(CH_3)_2$ - CH_2 morfolin-4-ile; (in una forma di realizzazione R^c è $-C(CH_3)_2$ - (piperazin-1-ile), $-C(CH_3)_2$ -(4-metilpiperazin-1-ile), $-C(CH_3)_2$ -(4-etilpiperazin-1-ile), $-C(CH_3)_2$ -N(CH₃)ossetan-3-ile, $-C(CH_3)_2$ -N(CH₂CH₃)ossetan-3-ile, $-C(CH_3)_2$ -NHossetan-3-ile, $-C(CH_3)_2$ -2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile, $-C(CH_3)_2$ -(4-metil-3-ossopiperazin-1-ile, o $-C(CH_3)_2$ -(4-(2-etossietil)- piperazin-1-ile), come $-C(CH_3)_2$ -(piperazin-1-ile), $-C(CH_3)_2$ -(4-metilpiperazin-1-ile), $-C(CH_3)_2$ -(4-etilpiperazin-1-ile), $-C(CH_3)_2$ -N(CH₃)ossetan-3-ile, $-C(CH_3)_2$ -N(CH₂CH₃)ossetan-3-ile, $-C(CH_3)_2$ -NHossetan-3-ile, $-C(CH_3)_2$ -2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-ile);

dove X è un gruppo uscente capace di essere spostato dall'atomo di azoto del gruppo Z in condizioni di reazione di accoppiamento amidico.

Definizioni:

Se non diversamente indicato i seguenti termini utilizzati nella descrizione e nelle rivendicazioni sono definiti per gli scopi di questa Domanda e hanno i seguenti significati:

"Alchile" indica un radicale idrocarburico monovalente saturo lineare avente da uno a sei atomi di carbonio oppure un radicale

idrocarburico monovalente saturo ramificato avente da tre a sei atomi di carbonio, ad esempio, metile, etile, propile, 2-propile, butile (incluse tutte le forme isomeriche), pentile (incluse tutte le forme isomeriche), e simili.

"Alcossi" indica un radicale -OR dove R è alchile come sopra definito, ad esempio, metossi, etossi, propossi, o 2-propossi, *n*-, *iso*-, o *terz*-butossi, e simili.

"Alcossialchile" indica un radicale idrocarburico monovalente lineare avente da uno a sei atomi di carbonio oppure un radicale idrocarburico monovalente ramificato avente da tre a sei atomi di carbonio sostituito con un gruppo alcossi come sopra definito, ad esempio 2-metossietile, 1-, 2-, o 3-metossipropile, 2-etossietile, e simili.

"Idrossialchile" indica un radicale idrocarburico monovalente lineare avente da uno a sei atomi di carbonio oppure un radicale idrocarburico monovalente ramificato avente da tre a sei atomi di carbonio sostituito con un gruppo idrossi come sopra definito, ad esempio 2-idrossietile, 1, 3-diidrossipropile, e simili.

"Alchilsolfonile" indica un radicale -SO₂R dove R è alchile come sopra definito, ad esempio metilsolfonile, etilsolfonile, e simili.

"Alcossicarbonile" indica un radicale -C(O)OR dove R è alchile come sopra definito, ad esempio metossicarbonile, etossicarbonile, e simili.

"Acile" indica radicale -COR dove R è alchile come sopra definito.

"Cicloalchile" indica un radicale idrocarburico monovalente saturo ciclico avente da tre a dieci atomi di carbonio in cui uno o due atomi di carbonio possono essere sostituiti da un gruppo osso, ad esempio ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, o cicloesile, e simili.

"Alo" indica fluoro, cloro, bromo, o iodo, come fluoro o cloro.

"Aloalchile" indica radicale alchilico come sopra definito, che è sostituito con uno o più atomi di alogeno, come da uno a cinque atomi di alogeno, quali fluoro o cloro, inclusi quelli sostituiti con alogeni differenti, ad esempio $-\text{CH}_2\text{Cl}$, $-\text{CF}_3$, $-\text{CHF}_2$, $-\text{CH}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}_2\text{CF}_3$, $-\text{CF}(\text{CH}_3)_2$, e simili.

La presente divulgazione include anche forme amorfe e polimorfe e forme deuterate dei composti qui divulgati.

Un "sale farmaceuticamente accettabile" di un composto indica un sale che farmaceuticamente accettabile e che possiede l'attività farmacologica desiderata del composto da quale il sale è realizzato (nel seguito della presente talvolta chiamato "composto genitore"). Tali sali includono:

sali di addizione acida formati con acidi inorganici come acido cloridrico, acido bromidrico, acido solforico, acido nitrico, acido fosforico e simili; oppure formati con acidi organici come acido formico, acido acetico, acido propionico, acido esanoico, acido ciclopentanpropionico, acido glicolico, acido piruvico, acido lattico, acido malonico, acido succinico, acido malico, acido maleico, acido fumarico, acido tartarico, acido citrico, acido benzoico, acido 3-(4-idrossibenzoil)benzoico, acido

cinnamico, acido mandelico, acido metansolfonico, acido etansolfonico, acido 1,2-etandisolfonico, acido 2-idrossietansolfonico, acido benzensolfonico, acido 4-clorobenzensolfonico, acido 2-naftalensolfonico, acido 4-toluensolfonico, acido canforsolfonico, acido glucoeptonico, acido 4,4'-metilenbis-(3-idrossi-2-en-1-carbossilico), acido 3-fenilpropionico, acido trimetilacetico, acido terzbutilacetico, acido lauril solforico, acido gluconico, acido glutammico, acido idrossinaftoico, acido salicilico, acido stearico, acido muconico; oppure

sali formati quando un protone acido presente nel composto genitore è sostituito da uno ione metallico, ad esempio uno ione di metallo alcalino, uno ione alcalino terroso, o uno ione di alluminio; oppure si coordina con una base organica come etanolammina, dietanolammina, trietanolammina, trometammina, *N*-metilglucammina. È inteso che i sali farmaceuticamente accettabili non sono tossici. Ulteriori informazioni su sali adatti farmaceuticamente accettabili possono essere reperite in Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a edizione., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985 e Berge et al., Journal of Pharmaceutical Sciences, gennaio 1977, volume 66, numero 1, 1-19.

I composti della presente invenzione possono avere centri di asimmetria. Alcuni composti della presente invenzione contenenti un atomo sostituito asimmetricamente possono essere isolati in forme otticamente attive o racemiche. È ben noto nell'arte come preparare forme otticamente attive, ad esempio mediante risoluzione di materiali.

Tutte le forme chirali, diastereomeriche e racemiche rientrano nella portata di questa invenzione, a meno che venga specificamente indicata la specifica stereochimica o forma isomerica.

Alcuni composti della presente invenzione possono esistere come tautomeri e/o isomeri geometrici. Tutti i possibili tautomeri e isomeri *cis* e *trans*, come forme singole e loro miscele rientrano nella portata di questa invenzione.

"Facoltativo" o "facoltativamente" indica che l'evento o la circostanza successivamente descritti possono ma non devono necessariamente avvenire, e che la descrizione include casi in cui l'evento o la circostanza avviene e casi in cui non avviene.

Un "veicolante o eccipiente farmaceuticamente accettabile" indica un veicolante o un eccipiente che è utile nella preparazione di una composizione farmaceutica che è generalmente sicuro, non tossico e né biologicamente né altrimenti non desiderabile, e include un veicolante o un eccipiente che è accettabile per l'uso farmaceutico umano.

Nell'accezione utilizzata nella descrizione e nelle rivendicazioni "un veicolante/eccipiente farmaceuticamente accettabile" include sia uno che più di uno di tali eccipienti.

"Trattare" o "trattamento" di una malattia include:

(1) prevenire la malattia, ossia fare sì che i sintomi clinici della malattia non si sviluppino in un mammifero che può essere esposto o predisposto alla malattia, ma non è ancora affetto da o non mostra

sintomi della malattia; (2) inibire la malattia, ossia arrestare o ridurre lo sviluppo della malattia o i suoi sintomi clinici; oppure

(3) alleviare la malattia, ossia provocare la regressione della malattia o dei suoi sintomi clinici.

Una "quantità terapeuticamente efficace" indica la quantità di un composto della presente divulgazione che, quando somministrata a un paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto di trattamento per trattare una malattia, è sufficiente ad effettuare tale trattamento per la malattia. La "quantità terapeuticamente efficace" varierà a seconda del composto, della malattia e della sua gravità, e dell'età, peso, eccetera del mammifero da trattare.

I composti qui divulgati sono inibitori di tirosin chinasi, in particolare di BTK e quindi sono utili nel trattamento di una malattia autoimmune, ad esempio malattia infiammatoria intestinale, artrite, lupus, artrite reumatoide, artrite psoriasica, osteoartrite, malattia di Still, artrite giovanile, diabete, miastenia gravis, tiroidite di Hashimoto, tiroidite di Ord, malattia di Graves, sindrome di Sjogren, incluso occhio secco di Sjogren, occhio secco non Sjogren, sclerosi multipla, sindrome di Guillain-Barre, encefalomielite acuta disseminata, malattia di Addison, sindrome dell'opsoclonomiocloni, spondilite anchilosante, sindrome da anticorpi antifosfolipidi, anemia aplastica, epatite autoimmune, celiachia, sindrome di Goodpasture, porpora trombocitopenica idiopatica, neurite ottica, sclerodermia, cirrosi biliare primitiva, sindrome di Reiter, arterite di Takayasu, arterite temporale,

anemia emolitica autoimmune da autoanticorpi caldi, granulomatosi di Wegener, psoriasi, alopecia universalis, sindrome di Behcet, stanchezza cronica, disautonomia, endometriosi, cistite interstiziale, neuromiotonia, sclerodermia, e vulvodinia.

I composti qui divulgati sono anche utili nel trattamento di una malattia o condizione eteroimmune. In un'altra forma di realizzazione qui descritta, il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da una malattia o condizione eteroimmune, ad esempio malattia del trapianto verso l'ospite, trapianto, trasfusione, anafilassi, allergia, ipersensibilità di tipo I, congiuntivite allergica, rinite allergica e dermatite atopica.

In un'altra forma di realizzazione qui divulgata, il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da una malattia infiammatoria ad esempio asma, appendicite, blefarite, bronchiolite, bronchite, borsite, cervicite, colangite, colecistite, colite, congiuntivite, cistite, dacrioadenite, dermatite, dermatomiosite, encefalite, endocardite, endometrite, enterite, enterocolite, epicondilite, epididimite, fascite, fibrosite, gastrite, gastroenterite, epatite, idrosadenite suppurativa, laringite, mastite, meningite, mielite, miocardite, miosite, nefrite, ooforite, orchite, osteite, otite, pancreatite, parotite, pericardite, peritonite, faringite, pleurite, flebite, infiammazione polmonare, polmonite, proctite, prostatite, pielonefrite, rinite, salpingite, sinusite, stomatite, sinovite, tendinite, tonsillite, uveite, vaginite, vasculite e vulvite. In una forma di realizzazione la malattia infiammatoria è asma.

In un'altra forma di realizzazione qui divulgata il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da malattia cutanea infiammatoria che include, a titolo di esempio, dermatite, dermatite da contatto, eczema, rosacea, e lesioni psoriasiche cicatriziali di cute, articolazioni o altri tessuti od organi.

In ancora un'altra forma di realizzazione qui divulgata il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da un cancro. In una forma di realizzazione il cancro è un disturbo proliferativo delle cellule B, ad esempio linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma follicolare, linfoma linfocitico cronico, leucemia linfatica cronica, leucemia prolinfocitica a cellule B, leucemia mieloide cronica, leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL), B-ALL positiva al cromosoma Philadelphia, linfoma linfoplasmocitico/macroglobulinemia di Waldenstrom, linfoma splenico della zona marginale, mieloma delle plasmacellule, plasmocitoma, linfoma a cellule B della zona marginale extranodale, linfoma a cellule B della zona marginale nodale, linfoma mantellare, linfoma a grandi cellule B mediastinico (timico), linfoma a grandi cellule B intravascolare, linfoma primitivo effusivo, leucemia/linfoma di Burkitt, o granulomatosi linfomatoide. In alcune forme di realizzazione il composto qui divulgato è somministrato in combinazione con un altro agente anti-cancro, ad esempio l'agente anti-cancro è un inibitore della trasmissione di segnale di protein chinasi attivata da mitogeno, ad esempio U0126, PD98059, PD184352,

PD0325901, ARRY-142886, SB239063, SP600125, BAY 43-9006, wortmannina, o LY294002.

In ancora un'altra forma di realizzazione qui divulgata il paziente che ha bisogno o bisogno riconosciuto è affetto da un disturbo tromboembolico, ad esempio infarto del miocardio, angina pectoris, riuclusione dopo angioplastica, restenosi dopo angioplastica, riuclusione dopo bypass aortocoronarico, restenosi dopo bypass aortocoronarico, ictus, ischemia transitoria, un disturbo occlusivo arterioso periferico, embolismo polmonare e trombosi venosa profonda.

Ancora un'altra forma di realizzazione qui divulgata è l'uso di composti e/o di un loro sale farmaceuticamente accettabile qui divulgati per l'uso come medicinale. In una forma di realizzazione l'uso è per il trattamento di malattia infiammatoria o malattie proliferative.

In qualsiasi delle forme di realizzazione summenzionate qui divulgate che coinvolgono il trattamento di malattie proliferative, incluso il cancro, vi sono ulteriori forme di realizzazione che coinvolgono la politerapia. In queste forme di realizzazione il composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato è somministrato in combinazione con almeno un agente aggiuntivo scelto tra alemtuzumab, triossido di arsenico, asparaginasi (pegilata o non), bevacizumab, cetuximab, composti a base di platino come cisplatino, cladribina, daunorubicina/doxorubicina/idarubicina, irinotecan, fludarabina, 5-fluorouracile, gemtuzamab, metotrexato, paclitaxel, Taxol™, docetaxel, temozolomide, tioguanina, o classi di farmaci che

includono ormoni (un antiestrogeno, un antiandrogeno, e analoghi dell'ormone di rilascio delle gonadotropine, interferoni come interferone alfa, mostarde azotate come busulfano, melfalan e mecloretamina, retinoidi come tretinoina, inibitori della topoisomerasi come irinotecan e topotecan, inibitori di tirosin chinasi come gefinitinib o imatinib, e agenti per il trattamento di segni o sintomi indotti da tale terapia, inclusi ad esempio allopurinolo, filgrastim, granisetron/ondansetron/ palonosetron e dronabinol. Quando è utilizzata la politerapia gli agenti possono essere somministrati simultaneamente o sequenzialmente. L'attività chinasi-inibitrice dei composti della presente divulgazione può essere testata mediante metodi ben noti nell'arte. L'attività BTK-inibitrice dei composti e/o di un loro sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione può essere testata utilizzando i saggi *in vitro* e *in vivo* descritti nei seguenti esempi biologici 1-3. Si considera una determinazione di attività chinasi-inibitoria mediante qualsiasi di tali saggi essere attività chinasi-inibitoria rientrante nella portata di questa divulgazione, anche se qualsiasi o tutti gli altri saggi non danno come risultato una determinazione di attività chinasi-inibitoria.

Senza volersi legare ad alcuna specifica teoria meccanicistica, in quelle forme di realizzazione in cui il composto della presente divulgazione è un inibitore covalente reversibile, si ritiene che il gruppo solfidrile della cisteina e un atomo di carbonio che fa parte del doppio legame carbonio-carbonio (ossia olefinico) del composto della presente divulgazione possono formare un legame covalente reversibile, ossia

labile, qui definito, come quello in cui Cys 481 attacca un atomo di carbonio elettroneficiente del doppio legame carbonio-carbonio (olefinico) nel composto della presente divulgazione per formare un addotto tiolico (ad esempio una reazione di Michael con cisteina).

In alcune forme di realizzazione l'atomo di carbonio elettroneficiente dell'olefina è distale rispetto al carbonio legato al gruppo ciano e alla porzione elettroneattrice -Z-CO- (si veda formula IA) nei composti della presente divulgazione. Pertanto la combinazione delle porzioni ciano e "-Z-CO-" e della porzione olefinica alla quale esse sono legate nei composti della presente divulgazione può aumentare la reattività dell'olefina per la formazione di un addotto tiolico con il residuo di cisteina del sito attivo di BTK.

I composti della presente divulgazione si legano con BTK in due differenti maniere. Oltre al legame covalente labile sopra discusso, essi formano anche un legame non covalente (ad esempio mediante legame di van der Waals, legame idrogeno, legame idrofobico, legame idrofilico e/o legame a carica elettrostatica) con BTK, il legame non covalente essendo sufficiente ad inibire almeno parzialmente l'attività chinasi della BTK.

Come qui divulgato il legame covalente labile tra il composto della divulgazione e BTK avviene tra l'olefina dell'inibitore e la catena laterale tiolica del residuo di cisteina 481 in corrispondenza o vicino al sito dove il composto possiede il summenzionato legame non covalente con la BTK.

Come evidente i composti della presente divulgazione che sono inibitori covalenti reversibili presentano sia un legame covalente mediato da cisteina che un legame non covalente con la BTK. Ciò differisce dagli inibitori reversibili non covalenti che inibiscono la BTK solamente mediante legame non covalente e sono privi del legame covalente mediato da cisteina.

Il risultato del legame dei composti della presente divulgazione con BTK nelle due diverse maniere è un inibitore covalente reversibile che possiede una velocità di dissociazione lenta e una durata di azione protratta, in alcuni casi comparabile ad un inibitore covalente irreversibile, senza formare prodotti proteici irreversibili permanenti. La differenza tra gli inibitori covalenti irreversibili e reversibili, in particolare i composti qui divulgati, può essere accertata utilizzando saggi qui divulgati.

In generale il legame implicato in un inibitore che forma un legame covalente reversibile con BTK, ossia i composti qui divulgati, è stabile quando la BTK si trova in alcune configurazioni ed è suscettibile di rottura quando la BTK si trova in configurazioni diverse (in entrambi i casi in condizioni fisiologiche), mentre l'interazione tra un inibitore che forma un legame covalente irreversibile è stabile in condizioni fisiologiche anche quando la BTK si trova in configurazioni differenti.

Un legame covalente reversibile spesso conferisce proprietà uniche relative al tempo di permanenza del composto all'interno del sito di legame contenente cisteina. In questo contesto il tempo di

permanenza si riferisce alla durata temporale del complesso composto-bersaglio in differenti condizioni (si veda Copeland RA, Pompliano DL, Meek TD. Drug-target residence time and its implications for lead optimization. *Nat. Rev. Drug Discov.* 5(9), 730-739 (2006).

La presenza di un legame covalente reversibile in un inibitore covalente reversibile come qui divulgato può portare ad un tempo di permanenza prolungato in confronto a un composto che non forma un legame covalente con BTK. In una forma di realizzazione qui divulgata i composti della presente divulgazione che sono inibitori covalenti reversibili possiedono un tempo di permanenza di almeno circa 1 ora, il tempo di permanenza può essere misurato utilizzando un saggio di occupazione in un ambiente biochimico o cellulare (si veda il seguente esempio biologico 7). Inoltre il tempo di permanenza può essere misurato utilizzando un saggio funzionale seguendo un definito periodo di wash-out.

Composti che formano un legame covalente irreversibile in un inibitore covalente irreversibile condividono queste proprietà di tempo di permanenza prolungato, ma tuttavia possono essere distinti da un inibitore covalente reversibile utilizzando un saggio di reversibilità. La capacità del composto della divulgazione di formare un legame covalente reversibile con Cys481 della BTK (ID di sequenza UniprotKB Q06187) e il legame olefinico nel composto della divulgazione, può essere determinata mediante i saggi descritti nei seguenti esempi biologici 5-8. Si considera una determinazione della reversibilità di

legame del legame covalente tra il residuo di cisteina e il legame olefinico del composto della divulgazione per mezzo di qualsiasi dei seguenti esempi biologici 5-8 essere la reversibilità di legame rientrante nella portata di questa divulgazione, anche se uno o più degli altri metodi non danno come risultato una determinazione di reversibilità di legame.

In generale, i composti di questa divulgazione saranno somministrati in una quantità terapeuticamente efficace mediante qualsiasi delle modalità di somministrazione accettate per agenti che servono simili utilizzi. Quantità terapeuticamente efficaci dei composti qui divulgati possono variare da circa 0,01 a circa 500 mg per kg di peso corporeo del paziente al giorno, che possono essere somministrati in singole dosi o in più dosi. Un livello di dosaggio adatto può essere da circa 0,01 a circa 250 mg/kg al giorno, da circa 0,05 a circa 100 mg/kg al giorno, o da circa 0,1 a circa 50 mg/kg al giorno. All'interno di questo intervallo il dosaggio può essere da circa 0,05 a circa 0,5, da circa 0,5 a circa 5, o da circa 5 a circa 50 mg/kg al giorno. Per la somministrazione orale le composizioni possono essere fornite sotto forma di compresse contenenti da circa 1,0 a circa 1000 milligrammi del principio attivo, in particolare circa 1, 5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750, 800, 900, e 1000 milligrammi del principio attivo. L'effettiva quantità somministrata del composto e/o di un suo sale farmaceuticamente accettabile di questa divulgazione, ossia il principio attivo, dipenderà da numerosi fattori come la gravità della malattia da

trattare, l'età e il relativo stato di salute del paziente, la potenza del composto e/o del suo sale farmaceuticamente accettabile che si utilizza, la via e forma di somministrazione, e altri fattori.

In generale composti e/o sali farmaceuticamente accettabili di questa divulgazione saranno somministrati come composizioni farmaceutiche mediante una qualsiasi delle seguenti vie: somministrazione orale, sistemica (per esempio transdermica, intranasale o mediante supposta), topica, o parenterale (ad esempio intramuscolare, endovenosa o sottocutanea). Il modo di somministrazione preferito è quello orale utilizzando un regime posologico giornaliero conveniente, che può essere regolato secondo il grado di sofferenza. Le composizioni possono prendere la forma di compresse, capsule, semisolidi, polveri, formulazioni a rilascio prolungato, formulazioni con rivestimento enterico o a rilascio ritardato, soluzioni, sospensioni, elisir, aerosol, o qualsiasi altra composizione appropriata.

La scelta della formulazione dipende da vari fattori come il modo di somministrazione del farmaco (ad esempio per la somministrazione orale sono preferite formulazioni sotto forma di compresse, pillole o capsule) e la biodisponibilità della sostanza farmaceutica. Recentemente sono state sviluppate formulazioni farmaceutiche in modo specifico per farmaci che mostrano una scarsa biodisponibilità, basate sul principio che la biodisponibilità può essere aumentata aumentando l'area superficiale, ossia diminuendo le

dimensioni delle particelle. Ad esempio il brevetto U.S. N. 4,107,288 descrive una formulazione farmaceutica avente particelle che rientrano nell'intervallo di dimensioni da 10 a 1.000 nm, in cui il principio attivo è supportato su una matrice reticolata di macromolecole. Il brevetto U.S. N. 5,145,684 descrive la produzione di una formulazione farmaceutica in cui la sostanza farmaceutica è polverizzata in nanoparticelle (dimensione particellare media di 400 nm) in presenza di un modificatore superficiale e successivamente dispersa in un mezzo liquido andare una formulazione farmaceutica che mostra una biodisponibilità notevolmente elevata.

Le composizioni sono composte generalmente di un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato in combinazione con almeno un eccipiente farmaceuticamente accettabile, come leganti, tensioattivi, diluenti, agenti tampone, antiaderenti, glidanti, polimeri idrofili o idrofobi, ritardanti, agenti stabilizzanti o stabilizzanti, disintegranti o superdisintegranti, antiossidanti, agenti antischiuma, cariche, aromatizzanti, coloranti, lubrificanti, sorbenti, conservanti, plasticizzanti e dolcificanti. Gli eccipienti accettabili sono non tossici, aiutano la somministrazione e non influenzano negativamente il beneficio terapeutico del composto qui divulgato. Tale eccipiente può essere qualsiasi eccipiente solido, liquido, semisolido o, nel caso di una composizione in aerosol, gassoso, che è generalmente disponibile ad un tecnico del ramo.

Eccipienti farmaceutici solidi includono amido, cellulosa, talco, glucosio, lattosio, saccarosio, gelatina, malto, riso, farina, gesso, gel di silice, stearato di magnesio, stearato di sodio, glicerolo monostearato, sodio cloruro, latte scremato disidratato e simili. Eccipienti liquidi e semisolidi possono essere selezionati tra glicerolo, glicole propilenico, acqua, etanolo e vari oli, inclusi quelli derivati dal petrolio, di origine animale, di origine vegetale o di origine sintetica, ad esempio olio di arachidi, olio di soia, olio minerale, olio di sesamo, eccetera. Veicolanti liquidi, in particolare per soluzioni iniettabili, includono acqua, soluzione salina, destrosio acquoso e glicoli.

I composti e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione possono anche essere somministrati per via intranasale. Formulazioni intranasali sono note nell'arte, si vedano ad esempio i brevetti U.S. N. 4,476,116, 5,116,817 e 6,391,452. La scelta di eccipienti dipenderà dalla natura della forma farmaceutica nasale, ad esempio soluzioni, sospensioni o polvere. Per la somministrazione mediante inalazione i composti e/o sali farmaceuticamente accettabili della presente divulgazione possono essere sotto forma di soluzioni, sospensioni e polveri. Queste formulazioni sono somministrate come un aerosol, una nebbia, o una polvere e possono essere erogate da confezioni pressurizzate o da un nebulizzatore dotato di un adatto propellente come diclorodifluorometano, triclorofluorometano, azoto, diossido di carbonio, eccetera. Nel caso di un aerosol pressurizzato l'unità di dosaggio può essere determinata fornendo una valvola per

erogare una quantità misurata. Capsule e cartucce da utilizzare in un inalatore possono essere formulate in modo da contenere una miscela in polvere del composto qui divulgato e una base in polvere idonea, quale lattosio o amido.

La formulazione topica può essere costituita da liquidi, sospensioni, emulsioni e simili, e può essere preparata mediante metodi ben noti nell'arte. La formulazione conterrà, in base alla percentuale in peso (% p), circa lo 0,01-99,99 % p di un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato sulla base della formulazione totale, il resto essendo costituito da uno o più eccipienti farmaceutici adatti, e può essere somministrata in dosi singole o in più dosi. Eccipienti idonei includono polimeri, tensioattivi, agenti tamponanti o di regolazione del pH, uno o più agenti di regolazione della tonicità e osmotici, conservanti, e agenti di dispersione.

Altri eccipienti farmaceutici adatti e loro formulazioni sono descritti in Remington's Pharmaceutical Sciences, edito da E. W. Martin (Mack Publishing Company, 20^a edizione, 2000).

Il livello del composto in una formulazione può variare all'interno di tutto l'intervallo impiegato dai tecnici del ramo. Tipicamente la formulazione conterrà, in base alla percentuale in peso (% p), circa lo 0,01-99,99 % p di un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato sulla base della formulazione totale, il resto essendo costituito da uno o più eccipienti farmaceutici adatti.

I composti e/o sali farmaceuticamente accettabili della presente divulgazione possono essere utilizzati in combinazione con uno o più altri farmaci nel trattamento di malattie o condizioni per le quali composti della presente divulgazione o gli altri farmaci possono essere utili, laddove la combinazione dei farmaci tra loro sia più sicura o più efficace di ciascun farmaco da solo. Tale uno o più altri farmaci possono essere somministrati attraverso una via e in una quantità comunemente utilizzate per essi, contemporaneamente o sequenzialmente a un composto della presente divulgazione. Quando un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione è usato contemporaneamente a uno o più altri farmaci, si preferisce una composizione farmaceutica in forma farmaceutica unitaria contenente tali altri farmaci e il composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione. Tuttavia la politerapia può anche includere terapie in cui il composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione e uno o più altri farmaci sono somministrati con programmi differenti sovrappoventisi. È contemplato anche che, quando usati in combinazione con uno o più altri principi attivi, i composti della presente invenzione e/o sali farmaceuticamente accettabili della presente divulgazione e gli altri principi attivi possono essere usati in dosi inferiori a quelle usate quando ciascuno è usato singolarmente.

Di conseguenza le composizioni farmaceutiche della presente divulgazione includono anche quelle che contengono uno o più altri

ingredienti attivi, oltre a un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione.

Le combinazioni di cui sopra includono combinazioni di un composto della presente divulgazione non solo con un altro composto attivo, ma anche con due o più altri composti attivi. Analogamente, i composti e/o sali farmaceuticamente accettabili della presente divulgazione possono essere usati in combinazione con altri farmaci che sono usati nella prevenzione, nel trattamento, nel controllo, nel miglioramento o nella riduzione del rischio delle malattie o condizioni per le quali i composti della presente divulgazione sono utili. Tali altri farmaci possono essere somministrati attraverso una via e in una quantità comunemente per essi usata dai tecnici del ramo, contemporaneamente o sequenzialmente a un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione. Quando un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione è usato contemporaneamente a uno o più altri farmaci, si preferisce una composizione farmaceutica contenente tali altri farmaci oltre al composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione. Di conseguenza le composizioni farmaceutiche della presente divulgazione includono anche quelle che contengono anche uno o più altri principi attivi, oltre a un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione. Il rapporto in peso tra il composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione e il secondo principio attivo può essere variato e

dipenderà dalla dose efficace di ciascun principio. Generalmente verrà usata una dose efficace di ciascuno.

Laddove il paziente soffra di o sia a rischio di soffrire di una malattia autoimmune, una malattia infiammatoria o una malattia allergica, un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione può essere utilizzato con uno o più dei seguenti agenti terapeutici in qualsiasi combinazione: immunosoppressori (ad esempio tacrolimus, dietilstilbestrolo, rapamicina, metotrexato, ciclofosfamide, azatioprina, mercaptopurina, micofenolato, o FTY720), glucocorticoidi (ad esempio prednisone, cortisone acetato, prednisolone, metilprednisolone, desametasone, betametasone, triamcinolone, beclometasone, fludrocortisone acetato, deossicorticosterone acetato, aldosterone), farmaci antinfiammatori non steroidei (ad esempio salicilati, acidi arilalcanoici, acidi 2-arilpropionici, acidi N-arilantranilici, oxicam, coxib, o sulfonanilidi), inibitori specifici di Cox-2 (ad esempio valdecoxib, celecoxib, o rofecoxib), leflunomide, auro tioglucosio, auro tiomalato, aurofin, sulfasalazina, idrossiclorochinino, minociclina, proteine leganti TNF-alfa (ad esempio infliximab, etanercept, o adalimumab), abatacept, anakinra, interferone-beta, interferone-gamma, interleuchina-2, vaccini per allergie, antistaminici, antileucotrieni, beta-agonisti, teofillina, e anticolinergici.

Laddove il paziente soffra di o sia a rischio di soffrire di un disturbo proliferativo a cellule B (ad esempio mieloma delle plasmacellule), il paziente può essere trattato con un composto e/o sale

farmaceuticamente accettabile qui divulgato in qualsiasi combinazione con uno o più altri agenti anti-cancro. In alcune forme di realizzazione uno o più degli agenti anti-cancro sono agenti proapoptotici. Esempi di agenti anti-cancro includono, ma senza limitarsi, qualsiasi dei seguenti: gossipolo, genasense, polifenolo E, clorofusina, acido all-trans retinoico (ATRA), briostatina, ligando induttore di apoptosi correlato al fattore di necrosi tumorale (TRAIL), 5-aza-2'-deossicitidina, acido all-trans retinoico, doxorubicina, vincristina, etoposide, gemcitabina, imatinib (Gleevec™), geldanamicina, 17-N-Allilammino-17-Demetossigeldanamicina (17-AAG), flavopiridolo, LY294002, bortezomib, trastuzumab, BAY 11-7082, PKC412, o PD184352, Taxol™, chiamato anche "paclitaxel", che è un farmaco anti-cancro ben noto che agisce potenziando e stabilizzando la formazione di microtubuli, e docetaxol, come Taxotere™. È stato anche mostrato che composti che possiedono lo scheletro base del taxano come caratteristica strutturale comune hanno la capacità di arrestare le cellule nelle fasi G2-M grazie a microtubuli stabilizzati, e possono essere utili per il trattamento del cancro in combinazione con i composti qui descritti.

Ulteriori esempi di agenti anti-cancro per l'uso in combinazione con un composto qui divulgato includono inibitori della trasmissione di segnale di protein chinasi attivata da mitogeno, ad esempio U0126, PD98059, PD184352, PD0325901, ARRY-142886, SB239063, SP600125, BAY 43-9006, wortmannina, o LY294002; inibitori di Syk; inibitori di mTOR; e anticorpi (ad esempio rituxan).

Altri agenti anti-cancro che possono essere impiegati in combinazione con un composto qui divulgato includono adriamicina, dactinomicina, bleomicina, vinblastina, cisplatino, acivicina; aclarubicina; acodazolo cloridrato; acronina; adozelesina; aldesleuchina; altretamina; ambomicina; ametantrone acetato; amminoglutetimide, amsacrina; anastrozolo; antramicina; asparaginasi; asperlina; azacitidina; azetepa; azotomicina; batimastat; benzodepa; bicalutammide; bisantrene cloridrato; bisnafide dimesilato; bizelesina; bleomicina solfato; brequinar sodio; bropirimina; busulfano; cactinomicina; calusterone; caracemide; carbetimer; carboplatino; carmustina; carubicina cloridrato; carzelesina; cedefingolo; clorambucile; cirolemicina; cladribina; crisnatolo mesilato; ciclofosfamide; citarabina; dacarbazina; daunorubicina cloridrato; decitabina; dexormaplatino; dezaguanina; dezaguanina mesilato; diaziquone; doxorubicina; doxorubicina cloridrato; droloxifene; droloxifene citrato; dromostanolone propionato; duazomicina; edatrexato; eflomitina cloridrato; elsamitrucina; enloplatino; enpromato; epipropidina; epirubicina cloridrato; erbulozolo; esorubicina cloridrato; estramustina; estramustina sodio fosfato; etanidazolo; etoposide; etoposide fosfato; etoprina; fadrozolo cloridrato; fazarabina; fenretinide; floxuridina; fludarabina fosfato; fluorouracile; flurocitabina; foschidone; fostriecina sodio; gemcitabina; gemcitabina cloridrato; idrossiurea; idarubicina cloridrato; ifosfammide; ilmofosina; interleuchina II (inclusa interleuchina II ricombinante, o rIL2), interferone alfa-2a; interferone

alfa-2b; interferone alfa-n1; interferone alfa-n3; interferone beta-1a; interferone gamma-1 b; iproplatino; irinotecano cloridrato; lanreotide acetato; letrozolo; leuprolide acetato; liarozolo cloridrato; lometrexolo sodio; lomustina; losoxantrone cloridrato; masoprocolo; maitansina; mecloretamina cloridrato; megestrolo acetato; melengestrolo acetato; melfalano; menogaril; mercaptopurina; metotrexato; sodio metotrexato; metoprina; meturedapa; mitindomide; mitocarcina; mitocromina; mitogillina; mitomalcina; mitomicina; mitosper; mitotano; mitoxantrone cloridrato; acido micofenolico; nocodazolo; nogalamicina; ormaplatino; oxisurano; pegaspargasi; peliomicina; pentamustina; peplomicina solfato; perfosfamide; pipobromano; piposulfano; piroxantrone cloridrato; plicamicina; plomestano; porfimer sodio; porfiomicina; prednimustina; procarbazine cloridrato; puromicina; puromicina cloridrato; pirazofurina; riboprina; rogletimide; safingolo; safingolo cloridrato; semustina; simtrazene; sparfosato sodio; sparsomicina; spirogermanio cloridrato; spiromustina; spiroplatino; streptonigrina; streptozocina; sulofenur; talisomicina; tecogalan sodio; tegafur; teloxantrone cloridrato; temoporfina; teniposide; teroxirone; testolattone; tiamiprina; tioguanina; tiotepa; tiazofurina; tirapazamina; toremifene citrato; trestolone acetato; triciribina fosfato; trimetrexato; trimetrexato glucuronato; triptorelina; tubulozolo cloridrato; uracil-mostarda; uredepa; vapreotide; verteporfina; vinblastina solfato; vincristina solfato; vindesina; vindesina solfato; vinepidina solfato; vinglicinato solfato;

vinleurosina solfato; vinorelbina tartrato; vinrosidina solfato; vinzolidina solfato; vorozolo; zeniplatina; zinostatina; e zorubicina cloridrato.

Altri agenti anti-cancro che possono essere impiegati in combinazione con un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato includono: 20-epi-1, 25 diidrossivitamina D3; 5-etiniluracile; abiraterone; aclarubicina; acilfulvene; adecipenol; adozelesina; aldesleuchina; antagonisti di ALL-TK; altretamina; ambamustina; amidox; amifostina; acido amminolevulinico; amrubicina; amsacrina; anagrelide; anastrozolo; andrografolide; inibitori dell'angiogenesi; antagonisti D; antagonisti G; antarelix; proteina-1 morfogenetica anti-dorsalizzante; antiandrogeno, carcinoma prostatico; antiestrogeno; antineoplaston; oligonucleotidi antisenso; afidicolina glicinato; modulatori genetici dell'apoptosi; regolatori dell'apoptosi; acido apurinico; ara-CDP-DL-PTBA; arginina deaminasi; asulacrina; atamestane; atrimustina; axinastatin 1; axinastatin 2; axinastatin 3; azasetron; azatoxin; azatirosina; derivati di baccatina III; balanolo; batimastat; antagonisti di BCR/ABL; benzoclorine; benzoilstaurosporine; derivati betalattamici; beta-aletine; betaclamicina B; acido betulinico; inibitore di bFGF; bicalutamide; bisantrene; bisaziridinilspermina; bisnafide; bistratene A; bizelesina; breflato; bropirimina; budotitanio; butionina solfossimina; calcipotriolo; calfofostina C; derivati di camptotecina; IL-2 di vaiolo del canarino; capecitabina; carbossamide-ammino-triazolo; carbossiamidotriazolo; CaRest M3; CARN 700; inibitore derivato da cartilagine; carzelesina; inibitori di

casein chinasi (ICOS); castanospermina; cecropina B; cetorelix;
clorine; clorochinossalina solfonammide; cicaprost; cis-porfirina;
cladribina; analoghi di clomifene; clotrimazolo; collismicina A;
collismicina B; combretastatina A4; analoghi di combretastatina;
conagenin; crambescidina 816; crisnatol; criptoficina 8; derivati di
criptoficina A; curacina A; ciclopentantrachinoni; cycloplatam;
cipemicina; citarabina ocfosfato; fattore citolitico; citostatina; dacliximab;
decitabina; deidrodidemnina B; deslorelina; desametasone;
dexifosfamide; dexrazoxano; dexverapamil; diaziquone; didemnina B;
didox; dietilnorspermina; diidro-5-azacitidina; 9-diossamicina; difenil
spiromustina; docosanolo; dolasetron; doxifluridina; droloxifene;
dronabinol; duocarmicina SA; ebselen; ecomustina; edelfosina;
edrecolomab; eflomitina; elemene; emitefur; epirubicina; epristeride;
analoghi di estramustina; agonisti degli estrogeni; antagonisti degli
estrogeni; etanidazolo; etoposide fosfato; exemestane; fadrozolo;
fazarabina; fenretinide; filgrastim; fmasteride; flavopiridolo; flezelastina;
fluasterone; fludarabina; fluorodaunorunicina cloridrato; forfenimex;
formestano; fostriecina; fotemustina; gadolinio texaphyrin; gallio nitrato;
galocitabina; ganirelix; inibitori di gelatinasi; gemcitabina; inibitori di
glutazione; epsulfam; eregulina; esametilene bisacetamide; ipericina;
acido ibandronico; idarubicina; idoxifene; idramantone; ilmofosine;
ilomastat; imidazoacridoni; imiquimod; peptidi immunostimolanti;
inibitore del recettore del fattore di crescita insulino-simile 1; agonisti
dell'interferone; interferoni; interleuchine; iobenguano;

iododoxorubicina; ipomeanololo, 4-; iroplact; irsogladina; isobengazolo; isoomoalicondrina B; itasetron; jasplalcinolide; kahalalide F; lamellarin-N triacetato; lanreotide; leinamicina; lenograstim; lentinano solfato; leptolstatina; letrozolo; fattore di inibizione della leucemia; interferone alfa leucocitario; leuprolide+estrogeno+progesterone; leuprorelin; levamisole; liarozolo; analogo di poliammina lineare; peptide disaccaride lipofilico; composti di platino lipofili; lissoclinamide 7; lobaplatino; lombricina; lometrexolo; lonidamina; losoxantrone; lovastatina; loxoribina; lurtotecan; lutezio texaphyrin; lisofillina; peptidi litici; maitansina; manostatina A; marimastat; masoprocol; maspin; inibitori di matrilisina; inibitori di metalloproteinasi della matrice; menogaril; merbarone; meterelin; metioninasi; metoclopramide; inibitori di MIF; mifepristone; miltefosina; mirimostim; RNA a doppio filamento ad appaiamento errato; mitoguazone; mitolattolo; analoghi di mitomicina; mitonafide; mitotoxin fattore di crescita dei fibroblasti-saporina; mitoxantrone; mofarotene; molgramostim; anticorpo monoclonale, gonadotropina corionica umana; monofosforil lipide A+ dietilstilbestrolo della parete cellulare sk; mopidamol; inibitore del gene della multi resistenza a farmaci; terapia basata su soppressore multiplo tumorale 1; agente anticancro a mostarda; micaperossido B; estratto di parete cellulare micobatterica; myriaporone; N-acetildinalina; benzamidi N-sostituite; nafarelin; nagrestip; naloxone+pentazocina; napavin; nafterpina; nartograstim; nedaplatino; nemorubicina; acido neridronico; endopeptidasi neutra; nilutamide; nisamicina; modulatori di ossido

nitrico; antiossidante nitrossido; nitrullina; O6-benzilguanina; octreotide;
okicenone; oligonucleotidi; onapristone; ondansetron; ondansetron;
oracin; induttore di citochinine orali; ormaplatino; osaterone;
oxaliplatino; oxaunomicina; palauamina; palmitoilrizoxina; acido
pamidronico; panaxitriolo; panomifene; parabactin; pazelliptina;
pegaspargasi; peldesina; pentosan polisolfato sodico; pentostatina;
pentozolo; perflubron; perfosfamide; alcol perillilico; fenazinomicina;
fenilacetato; inibitori di fosfatasi; picibanil; pilocarpina cloridrato;
pirarubicina; piritrexim; placetin A; placetin B; inibitore dell'attivatore di
plasminogeno; complesso di platino; composti di platino; complesso
platino-triammina; porfimer sodico; porfiromicina; prednisone; propil bis-
acridone; prostaglandina J2; inibitori del proteasoma;
immunomodulatore a base di proteina A; inibitore di protein chinasi C;
inibitori di protein chinasi C, microalgal; inibitori di protein tirosin
fosfatasi; inibitori di fosforilasi di nucleosidi purinici; purpurine;
pirazoloacridina; coniugato poliossietilenico di emoglobina piridossilata;
antagonisti di raf; raltitrexed; ramosetron; inibitori di ras farnesil protein
transferasi; inibitori di ras; inibitore di ras-GAP; retelliptina demetilata;
renio Re 186 etidronato; rizoxina; ribozimi; R.sub.11 retinamide;
rogletimide; rohitukina; romurtide; roquinimex; rubiginone B1; ruboxyl;
safingol; saintopin; SarCNU; sarcofitolo A; sargramostim; mimetici di
Sdi 1; semustina; senescence derivato 1; oligonucleotidi senso; inibitori
di trasduzione del segnale; modulatori di trasduzione del segnale;
proteina di legame di antigene a catena singola; sizofurano;

sobuzoxane; sodio borocaptato; sodio fenilacetato; solverol; proteina di legame di somatomedina; sonermin; acido sparfosico; spicamicina D; spiromustina; splenopentina; spongistatina 1; squalamina; inibitore di cellule staminali; inibitori della divisione di cellule staminali; stipiamide; inibitori di stromelisina; sulfinosine; antagonista di peptide intestinale vasoattivo superattivo; suradista; suramina; swainsonina; glicosamminoglicani sintetici; tallimustina; tamoxifene metioduro; tauromustina; tazarotene; tecogalan sodico; tegafur; telurapirilio; inibitori di telomerasi; temoporfin; temozolomide; teniposide; tetraclorodecaossido; tetrazomine; thaliblastine; tiocoraline; trombopoietina; mimetico di trombopoietina; thymalfasin; agonista del recettore di timopoietina; timotrinano; ormone di stimolazione della tiroide; stagno etil etiopurpurina; tirapazamine; titanocene bicloruro; topsentin; toremifene; fattore delle cellule staminali totipotenti; inibitori di traduzione; tretinoina; triacetiluridina; triciribina; trimetrexato; triptorelina; tropisetron; turosteride; inibitori di tirosin chinasi; tirfostina; inibitori di UBC; ubenimex; fattore di inibizione della crescita derivato dal seno urogenitale; antagonisti del recettore di urochinasi; vaporeotide; variolina B; sistema vettore, terapia genica degli eritrociti; velaresol; veramine; verdin; verteporfin; vinorelbina; vinxaltina; vitaxin; vorozolo; zanoterone; zeniplatino; zilascorb; e zinostatina stimalamer.

Ancora altri agenti anticancro che possono essere impiegati in combinazione con un composto qui divulgato includono agenti alchilanti, antimetaboliti, prodotti naturali, od ormoni, ad esempio

mostarde azotate (ad esempio mecloretamina, ciclofosfamide, clorambucile, eccetera), alchil solfonati (ad esempio busulfano), nitrosouree (ad esempio carmustina, lomustina, eccetera), o triazeni (decarbазina, eccetera). Esempi di metaboliti includono, ma senza limitarsi, analoghi di acido folico (ad esempio metotrexato), o analoghi di pirimidina (ad esempio citarabina), analoghi di purina (ad esempio mercaptopurina, tioguanina, pentostatina).

Esempi di prodotti naturali utili in combinazione con un composto o un sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato includono, ma senza limitarsi, alcaloidi della vinca (ad esempio dietilstilbestrolo, vincristina), epipodofillotossine (ad esempio etoposide), antibiotici (ad esempio daunorubicina, doxorubicina, bleomicina), enzimi (ad esempio L-asparaginasi), o modificatori della risposta biologica (ad esempio interferone alfa).

Esempi di agenti alchilanti che possono essere impiegati in combinazione con un composto o un sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato includono, ma senza limitarsi, mostarde azotate (ad esempio mecloretamina, ciclofosfamide, clorambucile, melfalan, eccetera), etilenimina e metilmelammine (ad esempio esametilmelamina, tiotepa), alchil solfonati (ad esempio busulfano), nitrosouree (ad esempio carmustina, lomustina, semustina, streptozocina, eccetera), o triazeni (decarbазina eccetera). Esempi di antimetaboliti includono, ma senza limitarsi, analogo di acido folico (ad esempio metotrexato) o analoghi di pirimidina (ad esempio

fluorouracile, floxuridina, citarabina), analoghi di purina (ad esempio mercaptopurina, tioguanina, pentostatina).

Esempi di ormoni e antagonisti utili in combinazione con un composto o un sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato includono, ma senza limitarsi, adrenocorticosteroidi (ad esempio prednisone), progestine (ad esempio idrossiprogesterone caproato, megestrolo acetato, medrossiprogesterone acetato), estrogeni (ad esempio dietilstilbestrolo, etinil estradiolo), antiestrogeno (ad esempio, tamoxifen), androgeni (ad esempio testosterone propionato, fluossimesterone), antiandrogeno (ad esempio flutamide), analogo dell'ormone di rilascio delle gonadotropine (ad esempio leuprolide). Altri agenti che possono essere utilizzati nei metodi e nelle composizioni qui descritti per il trattamento o la prevenzione del cancro includono complessi di coordinazione del platino (ad esempio cisplatino, carboplatino), antracenedione (ad esempio mitoxantrone), urea sostituita (ad esempio idrossiurea), derivato di metil idrazina (ad esempio procarbazine), soppressore adrenocorticale (ad esempio mitotane, aminoglutetimide).

Esempi di agenti anti-cancro che agiscono arrestando le cellule nelle fasi G2-M grazie a microtubuli stabilizzati che possono essere usati in combinazione con un composto inibitore di BTK e/o un sale farmaceuticamente accettabile della divulgazione includono senza limitazione i seguenti farmaci in commercio e farmaci in sviluppo: Erbulozolo (noto anche come R-55104), Dolastatina 10 (nota anche

come DLS-10 e NSC-376128), Mivobulin isetionato (noto anche come CI-980), Vincristina, NSC-639829, Discodermolide (noto anche come NVP-XX-A-296), ABT-751 (Abbott, noto anche come E-7010), Altorhyrtin (come Altorhyrtin A e Altorhyrtin C), Spongistatine (come Spongistatina 1, Spongistatina 2, Spongistatina 3, Spongistatina 4, Spongistatina 5, Spongistatina 6, Spongistatina 7, Spongistatina 8, e Spongistatina 9), Cemadotin cloridrato (noto anche come LU-103793 e NSC-D-669356), Epotiloni (come Epotilone A, Epotilone B, Epotilone C (noto anche come desossiepotilone A o dEpoA), Epotilone D (chiamato anche KOS-862, dEpoB, e desossiepotilone B), Epotilone E, Epotilone F, Epotilone B N-ossido, Epotilone A N-ossido, 16-aza-epotilone B, 21-amminoepotilone B (noto anche come BMS-310705), 21-idrossiepotilone D (noto anche come Desossiepotilone F e dEpoF), 26-fluoroepotilone), Auristatin PE (noto anche come NSC-654663), Soblidotin (noto anche come TZT-1027), LS-4559-P (Pharmacia, noto anche come LS-4577), LS-4578 (Pharmacia, noto anche come LS-477-P), LS-4477 (Pharmacia), LS-4559 (Pharmacia), RPR-112378 (Aventis), Vincristina solfato, DZ-3358 (Daiichi), FR-182877 (Fujisawa, noto anche come WS-9885B), GS-164 (Takeda), GS-198 (Takeda), KAR-2 (Accademia Ungherese delle Scienze), BSF-223651 (BASF, noto anche come ILX-651 e LU-223651), SAH-49960 (Lilly/Novartis), SDZ-268970 (Lilly/Novartis), AM-97 (Armad/Kyowa Hakko), AM-132 (Armad), AM-138 (Armad/Kyowa Hakko), IDN-5005 (Indena), Criptoficina 52 (nota anche come LY-355703), AC-7739 (Ajinomoto,

noto anche come AVE-8063A e CS-39.HCl), AC-7700 (Ajinomoto, noto anche come AVE-8062, AVE-8062A, CS-39-L-Ser.HCl, e RPR-258062A), Vitilevuamide, Tubulisina A, Canadensol, Centaureidina (nota anche come NSC-106969), T-138067 (Tularik, noto anche come T-67, TL-138067 e TI-138067), COBRA-1 (Parker Hughes Institute, noto anche come DDE-261 e WHI-261), H10 (Kansas State University), H16 (Kansas State University), Oncocidin A1 (noto anche come BTO-956 e DIME), DDE-313 (Parker Hughes Institute), Fijianolide B. Laulimalide, SPA-2 (Parker Hughes Institute), SPA-1 (Parker Hughes Institute, noto anche come SPIKET-P), 3-IAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, noto anche come MF-569), Narcosina (nota anche come NSC-5366), Nascapine, D-24851 (Asta Medica), A-105972 (Abbott), Emiasterlina, 3-BAABU (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine, noto anche come MF-191), TMPN (Arizona State University), Vanadocene acetilacetato, T-138026 (Tularik), Monsatrol, Inanocine (noto anche come NSC-698666), 3-1AABE (Cytoskeleton/Mt. Sinai School of Medicine), A-204197 (Abbott), T-607 (Tularik, noto anche come T-900607), RPR-115781 (Aventis), Eleuterobine (quali Desmetileleuterobina, Desaeleleuterobina, Isoeleuterobina A, e Z-Eleuterobina), Caribaeoside, Caribaeolin, Alicondrina B, D-64131 (Asta Medica), D-68144 (Asta Medica), Diazonamide A, A-293620 (Abbott), NPI-2350 (Nereus), Taccalonolide A, TUB-245 (Aventis), A-259754 (Abbott), Diozostatin, (-)-Phenylahistin (noto anche come NSCL-96F037), D-68838 (Asta Medica), D-68836 (Asta Medica), Myoseverin

B, D-43411 (Zentaris, noto anche come D-81862), A-289099 (Abbott), A-318315 (Abbott), HTI-286 (noto anche come SPA-110, sale trifluoroacetato) (Wyeth), D-82317 (Zentaris), D-82318 (Zentaris), SC-12983 (NCI), Resverastatin fosfato sodico, BPR-OY-007 (National Health Research Institutes), e SSR-250411 (Sanofi).

Laddove il paziente soffra di o sia a rischio di soffrire di un disturbo tromboembolico (ad esempio ictus), il paziente può essere trattato con un composto e/o un sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato in qualsiasi combinazione con uno o più altri agenti anti-tromboembolici. Esempi di agenti anti-tromboembolici includono, ma senza limitarsi, qualsiasi dei seguenti: agenti trombolitici (ad esempio alteplasi, anistreplasi, streptochinasi, urochinasi, o attivatore tissutale del plasminogeno), eparina, tinzaparina, warfarin, dabigatran (ad esempio dabigatran etexilato), inibitori del fattore Xa (ad esempio fondaparinux, draparinux, rivaroxaban, DX-9065a, otamixaban, LY517717, o YM150), ticlopidina, clopidogrel, CS-747 (prasugrel, LY640315), ximelagatran, o BIBR 1048.

Esempi

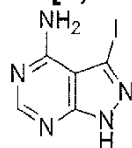
Le seguenti preparazioni di intermedi (riferimenti) e composti finali (esempi e esempi di riferimento) qui divulgati sono forniti per permettere ai tecnici del ramo di comprendere più chiaramente e di mettere in pratica la presente divulgazione. Essi non devono essere considerati come limitanti la portata della divulgazione, ma semplicemente come illustrativi e rappresentativi della stessa. La linea

~~~~~

in corrispondenza dal carbonio alchenico nei seguenti composti indica che i composti sono isolati come una miscela indefinita di isomeri (E) e (Z).

### Riferimento 1

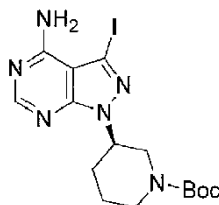
#### Sintesi di 3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina



Una miscela di 1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (150 g, 1,11 mol, 1,00 equiv) e N-iodo-succinimide (375 g, 1,67 mol, 1,58 equiv) in N,N-dimetilformammide (2,5 L) è stata agitata a 80°C per 5 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a temperatura ambiente e successivamente diluita con 10 L di acqua. Il solido è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con 2x1 L di sodio solfito acquoso saturo, ed essiccato sottovuoto a dare 150 g di 3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina come un solido giallo.

### Riferimento 2

#### Sintesi di (R)-terz-butyl 3-(4-ammino-3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbossilato



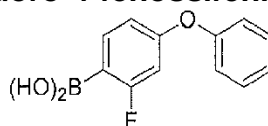
Ad una miscela in agitazione di 3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (5,9 g, 22,6 mmol, 1,00 equiv), (S)-terz-butyl 3-

idrossipiperidina-1-carbossilato (10 g, 50 mmol, 2,2 equiv) e trifenilfosfina (11,8 g, 45 mmol, 2,0 equiv) in tetraidrofurano (300 mL) a 10 °C è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di diisopropil azodicarbossilato in tetraidrofurano (30 mL) in 30 minuti. La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 12 ore e quindi concentrata sottovuoto. Il residuo è stato purificato su una colonna di gel di silice eluita con diclorometano/metanolo (100/1) a dare 3 g di (R)-terz-butil 3-(4-ammino-3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbossilato come un solido giallo.

Procedendo come sopra descritto ma sostituendo (S)-terz-butil 3-idrossipiperidina-1-carbossilato con (S)-terz-butil 2-(idrossimetil)pirrolidina-1-carbossilato ha fornito terz-butil (S)-2-([4-ammino-3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil)pirrolidina-1-carbossilato

### Riferimento 3

#### Sintesi di acido (2-fluoro-4-fenossifenil)-boronico



#### Passaggio 1

In un pallone a fondo tondo da 250 mL è stata posta una soluzione di 4-bromo-3-fluorofenolo (5 g, 26,18 mmol, 1,00 equiv) in diclorometano (100 mL), acido fenilboronico (3,5 g, 28,70 mmol, 1,10 equiv), Cu(AcO)<sub>2</sub> (5,7 g), trietilammina (5,3 g), e setacci molecolari 4A (15 g). La soluzione risultante è stata agitata per una notte a temperatura ambiente. I solidi sono stati rimossi per filtrazione. Il filtrato

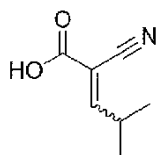
è stato essiccato su sodio solfato anidro e concentrato sottovuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:100-1:50). Ciò ha dato come risultato 2 g di 1-bromo-2-fluoro-4-fenossibenzene sotto forma di olio incolore.

### **Passaggio 2**

In un pallone a fondo tondo a tre colli da 100 mL spurgato e mantenuto sotto atmosfera inerte di azoto è stata posta una soluzione di 1-bromo-2-fluoro-4-fenossibenzene (2 g, 7,49 mmol, 1,00 equiv) in tetraidrofurano (20 mL). Si è aggiunto BuLi (1 M, 8 mL) goccia a goccia sotto agitazione tra -70 e -80 °C. La soluzione risultante è stata agitata per 30 minuti a -70-80 °C in un bagno di azoto liquido. Tris(propan-2-il)borato (1,7 g, 9,04 mmol, 1,21 equiv) è stato aggiunto goccia a goccia sotto agitazione tra -70 e -80 °C. La soluzione risultante è stata lasciata reagire, sotto agitazione, per ulteriori 2 ore mentre la temperatura veniva mantenuta tra -70 e -80 °C. La reazione è stata quindi spenta mediante l'aggiunta di 100 mL di acqua, estratta con etil acetato, e gli strati organici sono stati combinati ed essiccati sotto sodio solfato anidro e concentrati sottovuoto. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice ed eluito con etil acetato/etere di petrolio (1:20) a dare 1,6 g di acido (2-fluoro-4-fenossifenil)boronico sotto forma di un solido bianco.

### **Riferimento 4**

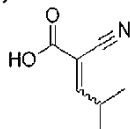
#### **Sintesi di acido 2-ciano-4-metilpent-2-enoico**



Ad una soluzione di acido 2-cianoacetico (8,7 g, 102 mmol) in metanolo (200 mL) si è aggiunto 2-metilpropanale (18,6 mL, 204 mmol) e la soluzione è stata agitata con una leggera esotermia notata. Dopo 30 minuti si è aggiunta piperidina (11,1 mL, 112 mmol) e si è continuato ad agitare per 1 ora prima di rimuovere il solvente sottovuoto mediante delicato riscaldamento. Il denso materiale è stato diluito con etere e lavato con 125 mL di HCl 1,0 M e quindi lavato con salamoia. La fase organica è stata essiccata su sodio solfato e concentrata a dare un olio incolore del peso di 11,2 g di acido 2-ciano-4-metilpent-2-enoico che è precipitato lasciando riposare.

### Riferimento 5

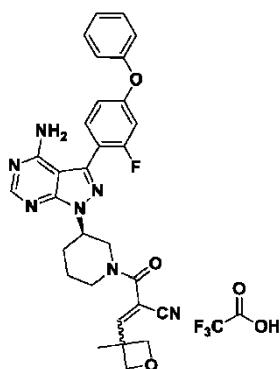
#### Sintesi di acido 2-ciano-4,4-dimetilpent-2-enoico



Seguendo la procedura usata nel riferimento tranne per il fatto di utilizzare pivalaldeide al posto di 2-metilpropanale si ottiene acido 2-ciano-4,4-dimetilpent-2-enoico.

#### Esempio di riferimento 1

Sintesi di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-3-(3-metilossetan-3-il)acrilonitrile sale di acido trifluoroacetico



### **Passaggio 1**

In un pallone da 100 mL sono stati posti 1,4-diossano (40 mL), acqua (10 mL), *tert*-butil (3*R*)-3-[4-ammino-3-iodo-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbossilato (3,108 g, 7,00 mmol, 1,00 equiv), acido (2-fluoro-4-fenossifenil)boronico (1,624 g, 7,00 mmol, 1,00 equiv), carbonato di potassio (2,898 g, 32,89 mmol, 4,70 equiv) e Pd(dppf)Cl<sub>2</sub> (57,1 mg, 0,4 mmol, 0,06 equiv). La soluzione risultante è stata agitata per tutta la notte a 80° C in un bagno d'olio. I solidi sono stati quindi rimossi per filtrazione e la soluzione risultante è stata diluita con acqua. La miscela risultante è stata estratta con etil acetato. Gli strati organici sono stati combinati, lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati. Il residuo è stato applicato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (1:3). Ciò ha dato come risultato 2,7 g di *tert*-butil (3*R*)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbossilato sotto forma di un solido nero.

### **Passaggio 2**

In un pallone da 100 mL sono stati posti *tert*-butil (3*R*)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1*H*-pirazolo[3,4-*d*]pirimidin-1-

il]piperidina-1-carbossilato (2,7 g, 5,35 mmol, 1,00 equiv) e diclorometano (20 mL). A ciò è seguita l'aggiunta di acido trifluoroacetico (5 mL). La soluzione risultante è stata agitata per 3 ore a temperatura ambiente. La miscela risultante è stata concentrata sotto vuoto. Ciò ha dato come risultato 2,6 g (grezzi) di 3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1-[(3R)-piperidin-3-il]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina sotto forma di un olio marrone.

### **Passaggio 3**

In un pallone da 50 mL sono stati posti TEA (5,05 g, 49,91 mmol, 10,0 equiv) 3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1-[(3R)-piperidin-3-il]-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (2,02 g, 4,99 mmol, 1,00 equiv), acido 2-cianoacetico (510 mg, 6,00 mmol, 1,20 equiv), HATU (2,28 g, 6,00 mmol, 1,20 equiv) e N,N-dimetilformammide (40 mL). La soluzione risultante è stata agitata per 4 ore a temperatura ambiente e successivamente diluita con 200 mL di acqua. La soluzione risultante è stata estratta con etil acetato e gli strati organici sono stati combinati, lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio anidro, filtrati e concentrati sotto vuoto. Ciò ha dato come risultato 600 mg di 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]-3-ossopropannitrile sotto forma di un solido giallo chiaro.

### **Passaggio 4**

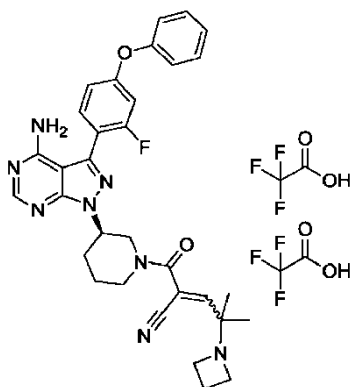
In un pallone da 50 mL è stata posta una soluzione di 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]-3-ossopropannitrile (300 mg, 0,64 mmol, 1,00 equiv) in

toluene (10 mL), 3-metilossetan-3-carbaldeide (127,4 mg, 1,27 mmol, 2,00 equiv) e piperidina (108,2 mg, 1,27 mmol, 2,00 equiv). La soluzione risultante è stata agitata per 4 ore a 110°C in un bagno d'olio e successivamente raffreddata e concentrata sotto vuoto. Il residuo è stato applicato su una colonna di gel di silice e purificato con etil acetato. Ciò ha dato come risultato prodotto (80 mg), che è stato ripurificato mediante Prep-HPLC con le seguenti condizioni (1#-Pre-HPLC-005(Waters)): Colonna, SunFire Prep C18 19\* 150 mm 5 um; fase mobile, acqua con acido trifluoroacetico 0,05% e CH<sub>3</sub>CN (10% CH<sub>3</sub>CN fino a 70% in 10 minuti); rivelatore, 254 nm. Ciò ha dato come risultato 22,9 mg (5%) di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-3-(3-metilossetan-3-il)acrilonitrile sale di acido trifluoroacetico sotto forma di un solido bianco. LC-MS (ES, *m/z*): [M-CF<sub>3</sub>COOH+H]<sup>+</sup> 554.

Procedendo come descritto nei precedenti passaggi 1, 2 e 3 ma sostituendo *terz*-butil (3R)-3-[4-ammino-3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbossilato con *terz*-butil (S)-2-([4-ammino-3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil)pirrolidina-1-carbossilato, è stato sintetizzato (S)-3-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)-metil)pirrolidin-1-il)-3-ossopropannitrile.

### **Esempio di riferimento 2**

Sintesi di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(azetidina-1-il)-4-metilpent-2-enitrile bis (2,2,2-trifluoroacetato)



### **Passaggio 1**

A una soluzione di 2-bromo-2-metilpropanale (0,6 g, 4 mmol, 1,0 equiv) in Et<sub>2</sub>O (20 mL) a 0°C è stata aggiunta goccia a goccia azetidina (684 mg, 12 mmol, 3,0 equiv). La miscela risultante è stata agitata a 0°C per 2 ore. La miscela è stata diluita con acqua ed estratta con Et<sub>2</sub>O. Lo strato organico combinato è stato essiccato su solfato di sodio anidro. I solidi sono stati filtrati e il solvente è stato concentrato sotto vuoto. Ciò ha dato come risultato 208 mg (41%) di 2-(azetidin-1-il)-2-metilpropanale sotto forma di un olio incolore.

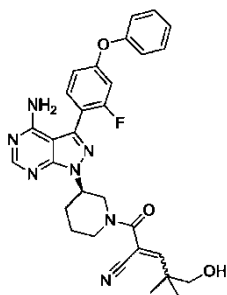
### **Passaggio 2**

Una soluzione di 3-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-3-ossopropannitrile (200 mg, 0,43 mmol, 1,0 equiv), 2-(azetidin-1-il)-2-metilpropanale (136,5 mg, 2,15 mmol, 5,0 equiv) e piperidina (73,1 mg, 0,86 mmol, 2,0 equiv) in toluene (10 mL) è stata agitata a 120°C per 3 ore. La miscela è stata quindi concentrata e il prodotto grezzo è stato purificato mediante prep-HPLC. Ciò ha dato come risultato 39,8 mg di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo [3, 4-d] pirimidin-1-il) piperidina-1-

carbonil)-4-(azetidina-1-il)-4-metilpent-2-enitrile bis (2,2,2-trifluoroacetato) sotto forma di un solido bianco. LCMS (ESI, ione pos.) m/z: 581 (M-2TFA+1).

### **Esempio di riferimento 3**

Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-5-idrossi-4,4-dimetilpent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

A una miscela di 2,2-dimetilpropan-1,3-diolo (5, g, 48,01 mmol) e imidazolo (4,9 g, 71,97 mmol) in DCM (100 mL) è stato aggiunto TMS-Cl (7,9 g, 52,42 mmol) e lo slurry risultante è stato agitato a temperatura ambiente per 1 ora. Dopo lavaggio con acqua e salamoia la fase organica è stata essiccata su solfato di sodio, filtrata, concentrata e purificata mediante cromatografia su colonna con 90:10 esani:etil acetato a dare 6,5 g di 3-((terz-butildimetilsilil)ossi)-2,2-dimetilpropan-1-olo sotto forma di un olio incolore.

### **Passaggio 2**

Una miscela grezza di 3-[terz-butil(dimetil)silil]ossi-2,2-dimetilpropanale (1,15 g, 5,31 mmol) è stata preparata mediante aggiunta di 1,1 equivalenti di periodinano di Dess-Martin a una soluzione di 3-

((terz-butildimetilsilil)ossi)-2,2-dimetilpropan-1-olo in 25 mL di DCM a 0° C. Dopo 1 ora, lo slurry è stato diluito con esani e filtrato su un tappo di silice. Il residuo è stato concentrato fino a diventare un olio denso e quindi dissolto in DCM (10 mL). Si è aggiunto 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidil]-3-ossopropannitrile (236,79 mg, 0,5000 mmol), successivamente TMS-Cl (0,2 mL, 1,59 mmol), seguito da pirrolidina (0,13 mL, 1,59 mmol). La soluzione è stata agitata a temperatura ambiente, monitorando la reazione mediante LCMS. Dopo 16 ore la miscela è stata separata tra acqua e DCM e successivamente la fase organica è stata lavata con salamoia ed essiccata su solfato di sodio. La filtrazione e la rimozione dei solventi hanno prodotto un olio incolore che è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (gradiente da 9:1 a 90:10 cloruro di metilene:MeOH) a dare ~350 mg di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-5-((terz-butildimetilsilil)ossi)-4,4-dimetilpent-2-enitrile.

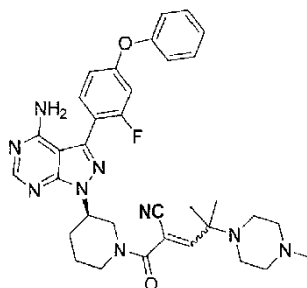
### **Passaggio 3**

A una soluzione di 2-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbonil]-5-[terz-butildimetilsilil]ossi)-4,4-dimetil-pent-2-enitrile (350 mg, 0,5200 mmol) in DCM (5 mL) sono stati aggiunti approssimativamente 2,5 ml di TFA e la soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. Il giorno dopo il composto è stato separato tra acqua e diclorometano e la fase organica è stata essiccata su solfato di sodio. Dopo filtrazione e

rimozione dei solventi il materiale grezzo è stato sottoposto a purificazione flash (gradiente 99:1-92:8 DCM:MeOH). Le frazioni pulite sono state concentrate, dissolte in un volume minimo di acetonitrile e acqua, congelate e liofilizzate per ottenere una polvere incolore che pesava 46 mg di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-5-idrossi-4,4-dimetilpent-2-enitrile. LC-MS (ES,  $m/z$ ): 557 [M+H].

#### **Esempio di riferimento 4**

**Sintesi di 2-[[[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]carbonil]-4-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)pent-2-enitrile**



#### **Passaggio 1**

In un pallone a fondo tondo a tre colli da 50 mL è stata posta una soluzione di 2-bromo-2-metilpropanale (2 g, 13,24 mmol, 1,00 equiv) in etere (10 mL). Ciò è stato seguito dall'aggiunta goccia a goccia di 1-metilpiperazina (4,66 g, 46,52 mmol, 3,51 equiv) a 0°C. La soluzione risultante è stata agitata a temperatura ambiente per una notte. Il solido è stato rimosso per filtrazione. The filtrato è stato diluito con acqua. La miscela risultante è stata lavata con etere. Il valore di pH degli strati acquosi è stato corretto a 12 con carbonato di potassio. La

soluzione risultante è stata estratta con diclorometano e gli strati organici sono stati combinati, lavati con salamoia, essiccati su sodio solfato e concentrati sottovuoto. Ciò ha dato come risultato 740 mg di 2-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)propanale sotto forma di un olio giallo.

### **Passaggio 2**

In un pallone a fondo tondo da 500 mL sono stati posti N,N-dimetilformammide (20 mL), 3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1-[(3R)-piperidin-3-il]-1 H-pirazolo [3,4-d]pirimidin-4-ammina (8,04 g, 19,88 mmol, 1,00 equiv), acido 2-cianoacetico (2,0 g, 23,51 mmol, 1,18 equiv), HATU (9,12 g, 24,00 mmol, 1,21 equiv) e TEA (21,2 mL, 10,00 equiv). La soluzione risultante è stata agitata per 4 ore a temperatura ambiente e quindi diluita con 500 mL di acqua. La soluzione risultante è stata estratta con 4x300 mL di etil acetato. Gli strati organici sono stati combinati, lavati con salamoia, essiccati su solfato di sodio, filtrati e concentrati sotto vuoto. Ciò ha dato come risultato 6,2 g di 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]-3-ossopropannitrile sotto forma di un solido giallo.

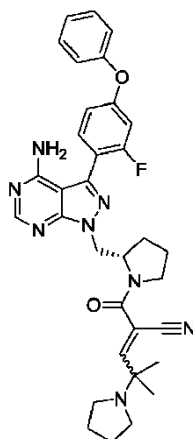
### **Passaggio 3**

In un pallone a fondo tondo da 100 mL è stata posta una soluzione di toluene (10 mL), 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]-3-ossopropannitrile (300 mg, 0,64 mmol, 1,00 equiv), 2-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)propanale (541,45 mg, 3,18 mmol, 5,00 equiv), e piperidina (108,29 mg, 1,27 mmol, 2,00 equiv). La soluzione risultante è

stata agitata per 3 ore a 120°C in un bagno di olio. La miscela risultante è stata concentrata sottovuoto. Il residuo è stato applicato su una colonna di gel di silice con etil acetato:MeOH (5:1). Il prodotto grezzo (70 mg) è stato purificato mediante Flash-Prep-HPLC con le seguenti condizioni (IntelFlash-1): Colonna, gel di silice C<sub>18</sub>; fase mobile, H<sub>2</sub>O(0,5%TFA)/CH<sub>3</sub>CN=10% aumentando a H<sub>2</sub>O(0,5%TFA)/CH<sub>3</sub>CN=40% entro 10 minuti; rivelatore, UV 254 nm. Ciò ha dato come risultato 46,4 mg (12%) di 2-[[[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]carbonil]-4-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)pent-2-ennitrile sotto forma di un solido bianco. LC-MS-PH-PBF-003-96-0: (ES, *m/z*): [M+H]<sup>+</sup> 625

### Esempio di riferimento 5

Sintesi di (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-1-il)-metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metil-4-(pirrolidina-1-il)pent-2-ennitrile



### Passaggio 1

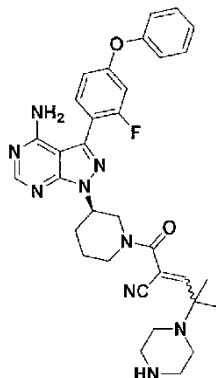
Ad una soluzione di 2-metilpropanale (5,6 mL, 61,8 mmol) in DCM (75 mL) raffreddata con un bagno di ghiaccio è stato aggiunto bromo (3,2 mL, 61,8 mmol) goccia a goccia. Dopo 1 ora, la soluzione è stata fatta evaporare, agitata in DCM (8 mL) a temperatura ambiente ed è stata aggiunta pirrolidina (0,94 mL, 11,26 mmol). Dopo aver agitato per 4 ore, la miscela è stata diluita con salamoia e gli strati sono stati separati. Lo strato organico è stato lavato con HCl 1 M e quindi lo strato acquoso è stato basificato con KOH a pH = 10-11. Questo è stato quindi estratto con DCM e gli strati organici sono stati combinati, essiccati (MgSO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati per isolare 2-metil-2-pirrolidin-1-il-propanale olio sotto forma di un olio.

### **Passaggio 2**

A una miscela di (S)-3-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidin-1-il)-3-ossopropannitrile (285 mg, 0,60 mmol), 2-metil-2-pirrolidin-1-il-propanale (719 mg, 5,1 mmol) e pirrolidina (0,23 mL, 2,8 mmol) in DCM (6 mL) a temperatura ambiente è stato aggiunto cloro(trimetil)silano (0,23 mL, 1,8 mmol). Dopo avere agitato 90 minuti, la soluzione è stata diluita con NaHCO<sub>3</sub> saturo ed estratta con DCM. Gli strati organici sono stati combinati, essiccati (MgSO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati. Il materiale grezzo è stato purificato mediante Isolera (10 g colonna: 0%-15% iPrOH/DCM) per ottenere 270 mg di (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metil-4-(pirrolidin-1-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 595 (M+1).

## Esempio di riferimento 6

### Sintesi di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(piperazin-1-il)pent-2-enitrile



#### Passaggio 1

In un pallone a fondo tondo da 250 mL è stata posta una soluzione di 2-bromo-2-metilpropanale (5 g, 33,11 mmol, 1,00 equiv) e terz-butil piperazina-1-carbossilato (18,6 g, 99,87 mmol, 3,02 equiv) in etere (80 mL). La soluzione risultante è stata agitata per una notte a 25° C. I solidi sono stati rimossi per filtrazione. Il filtrato organico è stato lavato con acqua, essiccato su sodio solfato anidro e concentrato sottovuoto a dare 6 g di terz-butil 4-(2-metil-1-ossopropan-2-il)piperazina-1-carbossilato sotto forma di un solido bianco.

#### Passaggio 2

In un pallone a fondo tondo da 100 mL sono stati posti 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidin-1-il]-3-ossopropanitrile (300 mg, 0,64 mmol, 1,00 equiv), piperidina (110 mg, 1,29 mmol, 2,03 equiv), toluene (30 mL) e terz-butil

4-(2-metil-1-ossopropan-2-il)piperazina-1-carbossilato (820 mg, 3,20 mmol, 5,03 equiv). La soluzione risultante è stata riscaldata a riflusso per tutta la notte. La reazione è stata spenta mediante l'aggiunta di acqua. La soluzione risultante è stata estratta con etil acetato e gli strati organici sono stati combinati, lavati con salamoia, essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati sottovuoto. Il residuo è stato applicato su una colonna di gel di silice con etil acetato/etere di petrolio (da 1:3 a 1:5). Ciò ha dato come risultato 170 mg di (R)-terz-butil 4-(5-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-ciano-2-metil-5-ossopent-3-en-2-il)piperazina-1-carbossilato sotto forma di olio giallo.

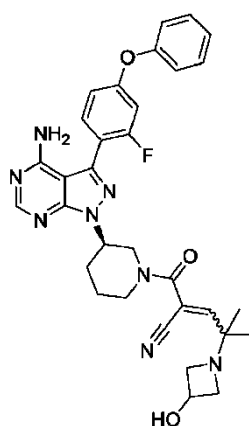
### **Passaggio 3**

In un pallone a fondo tondo da 30 mL raffreddato a 0°C sono stati posti diclorometano (8 mL), (R)-terz-butil 4-(5-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-ciano-2-metil-5-ossopent-3-en-2-il)piperazina-1-carbossilato (170 mg, 0,24 mmol, 1,00 equiv), e acido trifluoroacetico (2 mL). La soluzione risultante è stata agitata per 3 ore a 25° C. La miscela risultante è stata concentrata sottovuoto e il residuo è stato dissolto in DCM. La miscela risultante è stata lavata con 20 mL di potassio carbonato acquoso. Lo strato organico è stato essiccato su sodio solfato anidro, concentrato a dare il prodotto grezzo. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante ricristallizzazione da etere. Ciò ha dato come risultato 27 mg di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-

il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(piperazin-1-il)pent-2-enitrile sotto forma di un solido giallo chiaro. LCMS (ESI, ione pos.) m/z: 610 (M+1).

### **Esempio di riferimento 7**

Sintesi di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(3-idrossiazetidina-1-il)-4-metilpent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

A una soluzione di azetidina-3-olo cloridrato (5,11 g, 46,7 mmol, 1,0 equiv) e 1H-imidazolo (9,52 g, 140 mmol, 3,0 equiv) in DCM (100 mL) a 0° C è stato aggiunto goccia a goccia TBDPSCI (19,18 g, 70 mmol, 1,5 equiv). La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte e poi diluita con acqua ed estratta con DCM. Lo strato organico combinato è stato essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato eluito su gel di silice con DCM/MeOH = da 100/1 a 10/1 a dare 12 g di 3-(terz-butildifenilsililossi) azetidina sotto forma di un olio incolore.

### **Passaggio 2**

A una soluzione di 2-bromo-2-metilpropanale (2,14 g, 14,3 mmol, 1,0 equiv) in Et<sub>2</sub>O (150 mL) a 0° C è stata aggiunta goccia a goccia 3-(terz-butildifenilsililossi)azetidina (13,3 g, 42,9 mmol, 3,0 equiv). La miscela risultante è stata agitata a 0° C per 3 ore. La miscela è stata diluita con acqua e successivamente estratta con Et<sub>2</sub>O. Lo strato organico combinato è stato essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato applicato su gel di silice con etere di petrolio/etil acetato = da 20/1 a 5/1. Ciò ha dato come risultato 2,4 g (44%) di 2-(3-(terz-butildifenilsililossi) azetidina-1-il)-2-metilpropanale sotto forma di un olio incolore.

### **Passaggio 3**

A una soluzione di 3-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3, 4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-3-ossopropannitrile (471 mg, 1 mmol, 1,0 equiv), 2-(3-(terz-butildifenilsililossi)azetidina-1-il)-2-metilpropanale (762 mg, 2 mmol, 2,0 equiv) e pirrolidina (284 mg, 4 mmol, 4,0 equiv) in DCM (20 mL) è stato aggiunto goccia a goccia clorotrimetilsilano (216 mg, 2 mmol, 2,0 equiv). La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela è stata concentrata e il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna utilizzando etil acetato/MeOH = (da 100/1 a 20/1). Ciò ha dato come risultato 0,3 g (36%) di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo [3, 4-d]pirimidin-1-il) piperidina-1-carbonil)-4-(3-(terz-

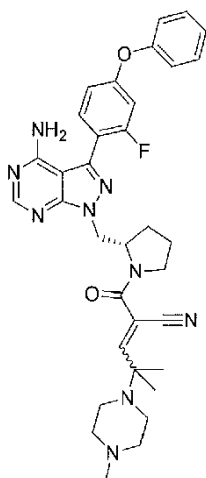
butildifenilsililossi)azetidina-1-il)-4-metilpent-2-enitrile sotto forma di un solido giallo chiaro.

#### **Passaggio 4**

A una soluzione di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo [3,4-d]pirimidina-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(3-(terz-butildifenilsililossi)azetidina-1-il)-4-metilpent-2-enitrile (300 mg, 0,36 mmol, 1,0 equiv) in THF (8 mL) è stata aggiunta una soluzione di TBAF 1 M in THF (0,432 mL, 0,432 mmol). La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela è stata concentrata e il prodotto grezzo è stato purificato mediante prep-HPLC eluendo con CH<sub>3</sub>CN/H<sub>2</sub>O (0,05%TFA). La fase organica è stata rimossa sotto pressione ridotta e la soluzione acquosa risultante è stata diluita con soluzione satura di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ed estratta con DCM. Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su solfato di sodio anidro, filtrato e concentrato sotto vuoto. Ciò ha dato come risultato 18,1 mg di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidina-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(3-idrossiazetidina-1-il)-4-metilpent-2-enitrile sotto forma di un solido bianco. LCMS (ESI, ione pos.) m/z: 597 (M+1).

#### **Esempio di riferimento 8**

**Sintesi di 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidina-1-il]-metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-(4-metilpiperazina-1-il)pent-2-enitrile**



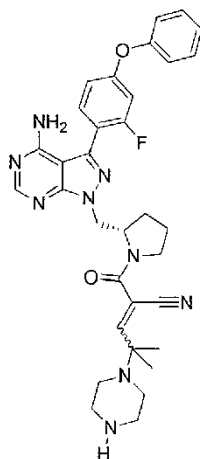
Ad una soluzione di 2-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)propanale (108,3 mg, 0,6400 mmol) in MeCN (6 mL) è stata aggiunta pirrolidina (0,11 mL, 1,27 mmol). La miscela di reazione è stata raffreddata a 0° C, a cui è seguita l'aggiunta di TMS-Cl (0,11 mL, 0,85 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela è stata agitata per 10 minuti prima di aggiungere 3-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-ossopropannitrile (100 mg, 0,210 mmol). La miscela è stata agitata per 3 ore a temperatura ambiente, controllando il progresso mediante TLC e LC-MS. Alla miscela sono stati aggiunti 15 ml di acqua ed è stata estratta con diclorometano. Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e fatto evaporare. Il residuo è stato se caricato su piastra TLC e purificato utilizzando MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> =9 :100 per ottenere il prodotto puro 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)pent-2-ennitrile (93 mg, 0,1491 mmol,

70,30 resa 2%) sotto forma di una polvere giallo chiaro. LC-MS (ES,  $m/z$ ): 625 [M+H].

Esempio 8A: Procedendo come sopra descritto ma sostituendo 2-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)propanale con 2-metil-2-(4-etilpiperazin-1-il)propanale, è stato sintetizzato 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-(4-etilpiperazin-1-il)pent-2-enitrile.

### Esempio di riferimento 9

**Sintesi di 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-piperazin-1-il-pent-2-enitrile**



### Passaggio 1

La 2-metilpropanale (1 mL, 10,96 mmol) è stata agitata in DCM (10 mL) mentre veniva raffreddata con un bagno di ghiaccio. Si è aggiunto lentamente bromo (0,62 mL, 12,05 mmol) mediante un imbuto gocciolatore nel corso di un periodo di 15 minuti. Dopo 1 ora di agitazione a 0 °C, la reazione è stata concentrata in un liquido giallo

chiaro. Questo è stato ridissolto in DCM (10 mL) e raffreddato con un bagno di ghiaccio mentre si aggiungeva lentamente il *terz*-butil piperazina-1-carbossilato (2,04 g, 10,96 mmol) (diluito con 5-10 mL di DCM) nel corso di un periodo di 30 minuti. Il bagno di raffreddamento è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte, la miscela è stata lavata con salamoia, successivamente il rimanente strato di DCM è stato essiccato mediante  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrato e concentrato per raccogliere *terz*-butil 4-(1,1-dimetil-2-osso-etil)piperazina-1-carbossilato sotto forma di un solido giallo chiaro che è stato utilizzato direttamente senza ulteriore purificazione.

### **Passaggio 2**

A una soluzione di *terz*-butil 4-(1,1-dimetil-2-osso-etil)piperazina-1-carbossilato (326,2 mg, 1,27 mmol) in DCM (6 mL), è stata aggiunta pirrolidina (0,17 mL, 2,04 mmol). La miscela di reazione è stata raffreddata a 0° C, a cui è seguita l'aggiunta di TMS-Cl (0,13 mL, 1,02 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela è stata agitata per 10 minuti prima di aggiungere 3-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-osso-propannitrile (120 mg, 0,250 mmol). La miscela è stata agitata per 4 ore a temperatura ambiente, a quel punto la TLC e la LC-MS hanno mostrato che la reazione era terminata. Alla miscela sono stati aggiunti 30 ml di acqua, gli strati sono stati separati e lo strato acquoso è stato estratto con  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrato e il solvente è stato rimosso

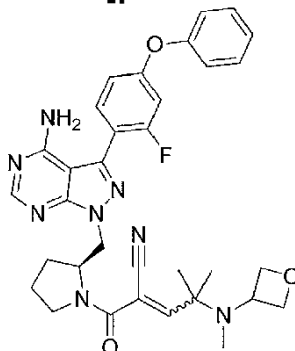
sottovuoto. Il residuo è stato dissolto in un minimo di CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, caricato su una colonna di gel di silice e purificato mediante MeOH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1/4): EtOAc gradiente 20-30% per ottenere il prodotto puro terz-butil 4-[4-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-ciano-1,1-dimetil-4-osso-but-2-enil]piperazina-1-carbossilato sotto forma di olio giallo chiaro

### **Passaggio 3**

Ad una soluzione di HCl 4 N in diossano (0,5 mL, 0,050 mmol) in THF (1mL) nel bagno di ghiaccio è stato aggiunto terz-butil 4-[4-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-ciano-1,1-dimetil-4-osso-but-2-enil]piperazina-1-carbossilato (32,9 mg, 0,050 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata per 4 ore a temperatura ambiente, a quel punto la TLC e la LC-MS hanno mostrato che la reazione era terminata. La miscela è stata concentrata sottovuoto, regolata con NaHCO<sub>3</sub> a pH 6-7, e lo strato acquoso è stato estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su over Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato, e il solvente è stato rimosso per ottenere il prodotto 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]-pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-piperazin-1-il-pent-2-enitrile (24 mg, 0,039 mmol, resa 85%) sotto forma di una polvere biancastra. LC-MS (ES, *m/z*): 610 [M+H]

### **Esempio di riferimento 10**

**Sintesi di 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-[metil(ossetan-3-il)ammino]pent-2-enitrile**



**Passaggio 1**

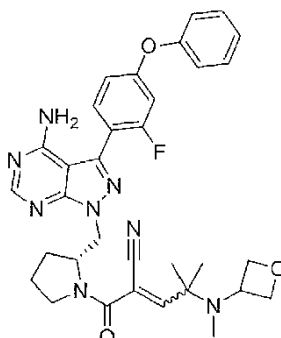
La 2-metilpropanale (0,5 mL, 5,48 mmol) è stata agitata in DCM (10 mL) mentre veniva raffreddata con un bagno di ghiaccio. Si è aggiunto lentamente bromo (0,31 mL, 6,03 mmol) mediante un imbuto gocciolatore nel corso di un periodo di 15 minuti. Dopo 1 ora di agitazione a 0 °C, la reazione è stata concentrata in un liquido giallo chiaro. Questo è stato ridissolto in DCM (5 mL) e raffreddato con un bagno di ghiaccio mentre si aggiungeva lentamente la N-metilossetan-3-ammina (0,49 mL, 5,48 mmol) (diluata con 5-10 mL di DCM) nel corso di un periodo di 10 minuti. Successivamente il bagno di raffreddamento è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela è stata lavata con salamoia, quindi lo strato di DCM rimanente è stato lavato con HCl 0,5 N. Lo strato acquoso combinato è stato regolato con KOH a pH 10-11, estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia ed essiccato mediante Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato per

raccogliere 2-metil-2-[metil(ossetan-3-il)ammino]propanale sotto forma di un liquido giallo chiaro. Il materiale grezzo è stato usato nel passaggio successivo direttamente senza ulteriore purificazione.

### **Passaggio 2**

A una soluzione di 2-metil-2-[metil(ossetan-3-il)ammino]propanale (100,0 mg, 0,6400 mmol) in DCM (5 mL), è stata aggiunta pirrolidina (0,06 mL, 0,760 mmol). La miscela di reazione è stata raffreddata a 0° C, a cui è seguita l'aggiunta di TMS-C1 (0,06 mL, 0,51 mmol), il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata per 10 minuti prima di aggiungere 3-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-ossopropannitrile (60 mg, 0,13 mmol). La miscela è stata agitata per 50 minuti e la reazione è stata giudicata terminata controllandone il progresso attraverso TLC e LC-MS. La miscela di reazione stata lavata con 15 ml di Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> saturo e gli strati sono stati separati. Lo strato acquoso è stato estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e il solvente è stato rimosso. Il residuo è stato caricato su una colonna di gel di silice e purificato mediante [MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1:4)]: EtOAc 20%, 30% per ottenere il prodotto puro 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-[metil(ossetan-3-il)ammino]pent-2-ennitrile (61,8 mg, 0,1012 mmol, resa 79,5%) sotto forma di un solido biancastro. LC-MS (ES, *m/z*): 612 [M+H]

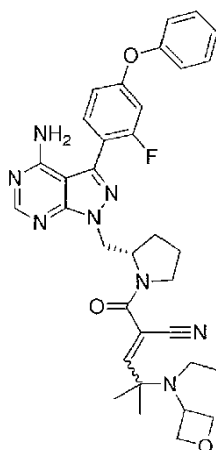
### Esempio di riferimento 10a



Procedendo come sopra descritto ma sostituendo (R)-3-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidin-1-il)-3-ossopropannitrile al posto di (S)-3-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidin-1-il)-3-ossopropannitrile, si è ottenuto (R)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-(metil(ossetan-3-il)ammino)-4-metilpent-2-enitrile. LC-MS (ES,  $m/z$ ): 612 [M+H]

### Esempio di riferimento 10b

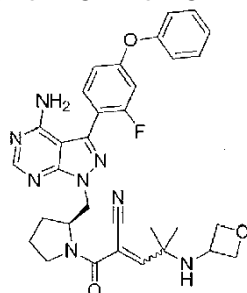
**(S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-(etil(ossetan-3-il)ammino)-4-metilpent-2-enitrile**



Procedendo come sopra descritto ma sostituendo N-etilossetan-3-ammina al posto di N-metilossetan-3-ammina, si è ottenuto (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-(etil(ossetan-3-il)ammino)-4-metilpent-2-ennitrile. LC-MS (ES,  $m/z$ ): 626 [M+H]

### Esempio di riferimento 11

**Sintesi di 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-(ossetan-3-ilamino)pent-2-ennitrile**



### Passaggio 1

Si è agitata 2-metilpropanale (0,5 mL, 5,48 mmol) in DCM (10 mL) mentre essa veniva raffreddata con un bagno di ghiaccio. Si è aggiunto lentamente bromo (0,31 mL, 6,03 mmol) mediante un imbuto

gocciolatore nel corso di un periodo di 15 minuti. Dopo 1 ora di agitazione a 0 °C, la reazione è stata concentrata in un liquido giallo chiaro. Questo è stato ridissolto in DCM (5 mL) e raffreddato con un bagno di ghiaccio mentre si aggiungeva lentamente la ossetan-3-ammina (0,39 mL, 5,48 mmol) (diluata con 5-10 mL di DCM) nel corso di un periodo di 10 minuti, successivamente il bagno di raffreddamento è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela è stata successivamente lavata con salamoia e lo strato di DCM rimanente è stato lavato con HCl 0,5 N. Lo strato acquoso combinato è stato portato con KOH a pH 10-11, estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, e lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia ed essiccato mediante Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato per raccogliere 2-metil-2-(ossetan-3-ilammino)propanale sotto forma di un liquido giallo chiaro. Il materiale grezzo è stato usato nel passaggio successivo direttamente senza ulteriore purificazione.

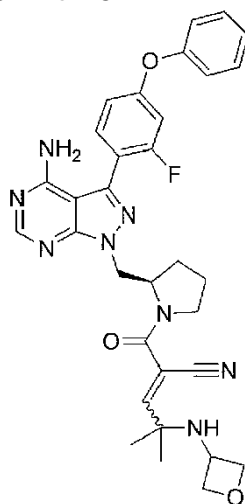
### **Passaggio 2**

A una soluzione di 2-metil-2-(ossetan-3-ilammino)propanale (106,3 mg, 0,7400 mmol) in DCM (5 mL) è stata aggiunta pirrolidina (0,07 mL, 0,890 mmol). La miscela di reazione è stata raffreddata a 0° C, a cui è seguita l'aggiunta di TMS-Cl (0,08 mL, 0,59 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di azione è stata agitata a temperatura ambiente per 10 minuti prima di aggiungere 3-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-osso-propannitrile (70 mg, 0,1500 mmol). La

miscela è stata agitata per 50 minuti, a quel punto è stata ritenuta terminata controllando le TLC e LC-MS. La miscela è stata lavata con Na<sub>2</sub>HCO<sub>3</sub> saturo e gli strati sono stati separati. Lo strato acquoso è stato estratto con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato, e il solvente è stato rimosso. Il residuo è stato caricato su una piastra di gel di silice, sottoposto a flash con [MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(1:4)]: EtOAc 50%, 60% per ottenere il prodotto puro 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidina-1-carbonil]-4-metil-4-(ossetan-3-ilammino)pent-2-ennitrile (35,6 mg, 0,0597 mmol, resa 40,2%) sotto forma di un solido biancastro. LC-MS (ES, *m/z*): 598 [M+H].

#### Esempio di riferimento 11a

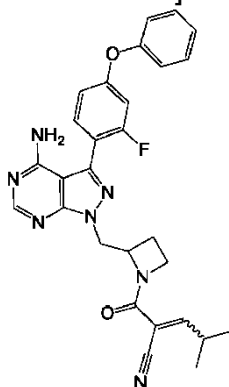
**Sintesi di (R)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metil-4-(ossetan-3-ilammino)pent-2-ennitrile**



Procedendo come sopra descritto ma sostituendo 3-[(2R)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo [3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-osso-propannitrile al posto di 3-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]pirrolidin-1-il]-3-osso-propannitrile, si è ottenuto (R)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1 H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metil-4-(ossetan-3-ilammino)pent-2-enitrile. LC-MS (ES,  $m/z$ ): 598 [M+H].

### **Esempio di riferimento 12**

Sintesi di 2-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-pent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

A una miscela di 3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (300 mg, 0,930 mmol), *tert*-butil 2-(idrossimetil)azetidina-1-carbossilato (0,33 mL, 1,9 mmol) e  $\text{PPh}_3$  (733,86 mg, 2,8 mmol) in THF (10 mL) in bagno di ghiaccio, è stato aggiunto lentamente il DIAD (0,37 mL, 1,87 mmol) come una soluzione in 5 ml di THF. La miscela è stata agitata a temperatura ambiente per

tutta la notte e poi è stato rimosso il solvente. Al residuo è stata aggiunta H<sub>2</sub>O e la miscela è stata estratta con EtOAc. Lo strato organico combinato è stato lavato con NaHCO<sub>3</sub>, poi salamoia, ed essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Il solvente è stato rimosso per ottenere terz-butil 2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbossilato del peso di 800 mg, che è stato utilizzato senza ulteriore purificazione per il passaggio successivo.

### **Passaggio 2**

Al terz-butil 2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbossilato grezzo (800 mg, 1,63 mmol) dissolto in DCM (4 mL) in bagno di ghiaccio è stato aggiunto lentamente goccia a goccia TFA (2 mL), agitando per 10 minuti; a questo punto materiale non iniziale è rimasto mediante analisi TLC. Il solvente è stato rimosso ed è stato aggiunto EtOAc, che è stato lavato con HCl 2 M. La soluzione acquosa combinata è stata portata con NaOH ad un pH attorno a 10, e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc. Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, e il solvente è stato rimosso per ottenere 450 mg di 1-(azetidina-2-ilmetil)-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina, che è stata utilizzata direttamente nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

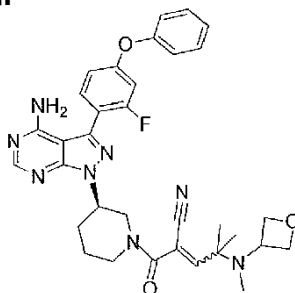
### **Passaggio 3**

A una soluzione di acido 2-ciano-4-metil-pent-2-enoico (30,7 mg, 0,220 mmol), 1-(azetidina-2-ilmetil)-3-(2-fluoro-4-fenossi-

fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (57,5 mg, 0,150 mmol in DCM (2 mL) sono stati aggiunti PyAOP (86,2 mg, 0,160 mmol) e TEA (0,06 mL, 0,440 mmol) e la soluzione gialla risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora. La LCMS ha mostrato che la reazione era completa e la miscela grezza è stata direttamente caricata su una cartuccia di gel di silice per la purificazione (da 3 a 5% MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La rimozione del solvente dalle frazioni più pulite ha prodotto 30 mg del composto desiderato 2-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-pent-2-enitrile (30 mg, 0,0586 mmol, resa 39,8%) valutato mediante LCMS. (M+1 = 512).

### **Esempio di riferimento 13**

**Sintesi di 2-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbonil]-4-metil-4-[metil(ossetan-3-il)ammino]pent-2-enitrile**

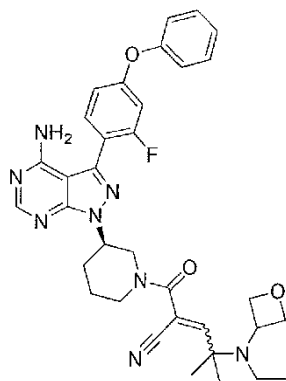


La miscela di 2-metil-2-[metil(ossetan-3-il)ammino]propanale (66,69 mg, 0,42 mmol), 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidil]-3-osso-propanenitrile (100 mg, 0,2100 mmol) e pirrolidina (0,1 mL, 1,27 mmol) è stata agitata a temperatura ambiente per 10 minuti. La miscela di reazione è stata

raffreddata a 0° C, a cui è seguita la giunta di TMS-Cl (0,11 mL, 0,85 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata per 1 altra ora a temperatura ambiente, controllando il processo mediante TLC e LC-MS. Il solvente è stato rimosso e il residuo risultante purificato mediante cromatografia su colonna (MeOH, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH a gradiente da 0 a 10% per ottenere 2-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbonil]-4-metil-4-[metil(ossetan-3-il)ammino]pent-2-enitrile (118,5 mg) sotto forma di una polvere bianca. LC-MS (ES, m/z): 612 [M+H]

#### **Esempio di riferimento 13a**

**Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(etil(ossetan-3-il)ammino)-4-metilpent-2-enitrile**

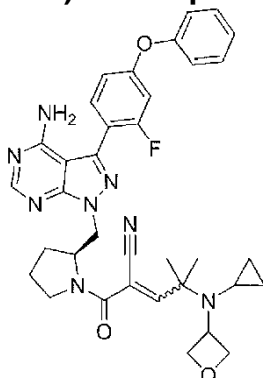


Procedendo come sopra descritto ma sostituendo N-etilossetan-3-ammina al posto di N-metilossetan-3-ammina, si è ottenuto (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-

d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(etil(ossetan-3-il)ammino)-4-metilpent-2-enitrile. LC-MS (ES,  $m/z$ ): 626 [M+H].

#### **Esempio di riferimento 13b**

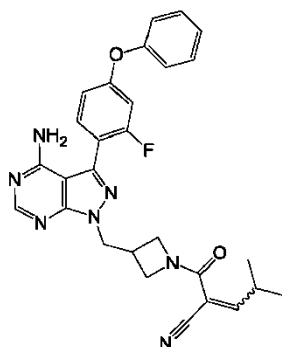
**Sintesi di (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-(ciclopropil(ossetan-3-il)ammino)-4-metilpent-2-enitrile**



Procedendo come descritto nell'esempio 13 ma sostituendo N-ciclopropilossetan-3-ammina al posto di N-metilossetan-3-ammina, si è ottenuto (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-(ciclopropil(ossetan-3-il)ammino)-4-metilpent-2-enitrile. LC-MS (ES,  $m/z$ ): 626 [M+H]

#### **Esempio di riferimento 14**

**Sintesi di 2-[3-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-pent-2-enitrile**



### **Passaggio 1**

La miscela di 3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (500 mg, 1,56 mmol),  $\text{PPh}_3$  (1,22 g, 4,67 mmol) e *tert*-butil 3-(idrossimetil)azetidina-1-carbossilato (437 mg, 2,33 mmol) in THF (10 mL) è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio e DIAD (0,61 mL, 3,11 mmol) in 5 ml THF è stato aggiunto goccia a goccia alla miscela di reazione. La miscela è stata agitata per 5 ore. Al residuo sono stati aggiunti 30 ml di acqua e lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc. Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrato, il solvente è stato rimosso e il *tert*-butil 3-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbossilato grezzo è stato utilizzato direttamente nel passaggio successivo.

### **Passaggio 2**

Si è raffreddato in un bagno di ghiaccio *tert*-butil 3-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbossilato (780 mg) in DCM (2 mL). A ciò è stato aggiunto TFA (4 mL, 1,59 mmol), il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora, controllando la

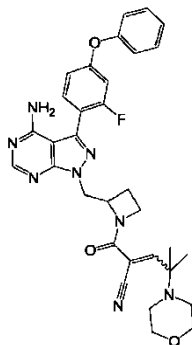
reazione tramite TLC e LC-MS. Dopo due ore il solvente è stato rimosso e al residuo è stata aggiunta acqua. Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc e lo strato organico combinato è stato lavato con HCl 2 N. Lo strato acquoso combinato è stato portato con NaOH a pH 9-10, estratto con EtOAc, e lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e filtrato. Il solvente è stato rimosso per ottenere acido 2-ciano-4-metil-pent-2-enoico (48,12 mg, 0,350 mmol) ,1-(azetidina-3-ilmetil)-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina, che è stata utilizzata nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

### **Passaggio 3**

A una soluzione di acido 2-ciano-4-metil-pent-2-enoico (48,12 mg, 0,350 mmol) ,1-(azetidina-3-ilmetil)-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (90 mg, 0,230 mmol) in DCM (2 mL) sono stati aggiunti PyAOP (134,9 mg, 0,250 mmol) e TEA (0,1 mL, 0,690 mmol) e la soluzione gialla risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora. La LCMS ha mostrato che la reazione era completa e la miscela grezza è stata direttamente caricata su una cartuccia di gel di silice per la purificazione (da 0,2 a 3% MeOH: CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>). La rimozione del solvente dalle frazioni più pulite ha prodotto 2-[3-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-pent-2-enitrile (12 mg LCMS. (M+1 = 512).

### **Esempio di riferimento 15**

Sintesi di 2-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-4-morfolino-pent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

A una miscela di 1-(azetidina-2-ilmetil)-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (236,4 mg, 0,610 mmol), acido 2-cianoacetico (77,2 mg, 0,910 mmol) in DCM (8 mL) in bagno di ghiaccio, sono stati aggiunti T3P (0,36 mL, 1,21 mmol) e TEA (0,34 mL, 2,42 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte. La miscela di reazione è stata caricata su una colonna di gel di silice, purificata con gradiente 0-3% MeOH:CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>, a dare 3-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-il]-3-ossopropanitrile (201 mg) sotto forma di un olio giallo.

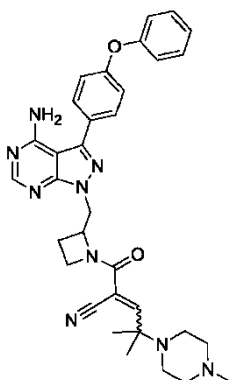
### **Passaggio 2**

Alla miscela di 3-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-il]-3-ossopropanitrile (90,6 mg, 0,200 mmol), 2-metil-2-morfolino-propanale (98,3 mg, 0,590 mmol) in DCM (2 mL) in un bagno di ghiaccio sono stati aggiunti

pirrodidina (0,1 mL, 1,19 mmol) e TMS-Cl (0,1 mL, 0,79 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora e la miscela di reazione è stata direttamente caricata su piastra di gel di silice, purificata mediante EtOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 5% a dare prodotto puro 2-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-4-morfolino-pent-2-enitrile (23 mg) sotto forma di una polvere bianca. LC-MS (ES, *m/z*): 597 [M+H]

#### Esempio di riferimento 16

Sintesi di 2-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)pent-2-enitrile

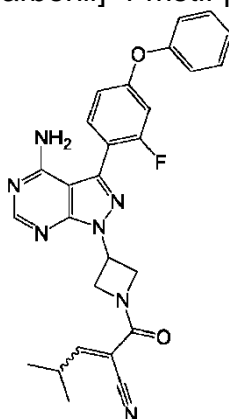


A una miscela di 3-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-il]-3-osso-propannitrile (100,6 mg, 0,220 mmol) e 2-metil-2-(4-metilpiperazin-1-il)propanale (118,2 mg, 0,660 mmol) in DCM (5 mL) in un bagno di ghiaccio sono stati aggiunti pirrodidina (0,11 mL, 1,32 mmol) e TMS-Cl (0,11 mL, 0,880 mmol). Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela di reazione è

stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora. La miscela di reazione grezza è stata caricata su piastra di gel di silice, purificata mediante MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> per ottenere 2-[2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]azetidina-1-carbonil]-4-metil-4-(4-metilpiperazin-1-il)pent-2-enitrile (19 mg) sotto forma di una polvere bianca. LC-MS (ES, *m/z*): 610 [M+H]

### **Esempio di riferimento 17**

Sintesi di 2-[3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]azetidina-1-carbonil]-4-metil-pent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

Una miscela di 3-iodo-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (3 g, 11,49 mmol), PPh<sub>3</sub> (9,03 g, 34,5 mmol) terz-butyl 3-idrossiazetidina-1-carbossilato (2,09 g, 12,1 mmol) in THF (60 mL) è stata raffreddata in un bagno di ghiaccio. Si è aggiunto lentamente alla miscela di reazione DIAD (4,52 mL, 23,0 mmol) in 30 ml THF in un imbuto gocciolatore, e la miscela di reazione è stata agitata per tutta la notte. Il solvente è stato rimosso ed è stata aggiunta H<sub>2</sub>O. Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc e lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia,

essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato, e il solvente è stato rimosso per ottenere  
terz-butil 3-[3-iodo-4-[(trifenil-{5}-fosfanilidene)ammino]pirazolo[3,4-  
d]pirimidin-1-il]azetidina-1-carbossilato, che è stato utilizzato così com'è  
per il passaggio successivo.

### **Passaggio 2**

La miscela di terz-butil 3-[3-iodo-4-[(trifenil-{5}-  
fosfanilidene)ammino]-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]azetidina-1-  
carbossilato (1,2 g, 1,77 mmol), acido (2-fluoro-4-fenossi-fenil)boronico  
(0,82 g, 3,55 mmol), tetrakis(trifenilfosfano)palladio(0) (102,4 mg, 0,089  
mmol) e K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (514 mg, 3,73 mmol) in 1,4 diossano (16 ml) e H<sub>2</sub>O (4  
ml), è stata spurgata con Ar<sub>2</sub> per 15 minuti. La provetta di reazione è  
stata sigillata e riscaldata in un forno a microonde a 180° C per 2 ore,  
15 minuti. Il solvente è stato rimosso e sono stati aggiunti acqua e  
EtOAc. La miscela è stata filtrata attraverso celite e separata. Lo strato  
acquoso è stato estratto con EtOAc e lo strato organico combinato è  
stato lavato con salamoia, essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato, e il solvente è  
stato rimosso per ottenere il terz-butil 3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-  
fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)azetidina-1-carbossilato  
(800 mg) grezzo, che è stato utilizzato direttamente nel passaggio  
successivo.

### **Passaggio 3**

Si è agitato terz-butil 3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-  
pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)azetidina-1-carbossilato (800 mg) in TFA (8  
mL) per 1 ora. Al residuo sono stati aggiunti EtOAc e 1 acqua e gli strati

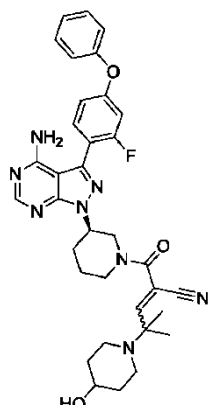
sono stati separati. Lo strato acquoso è stato estratto con EtOAc e lo strato organico combinato è stato fatto evaporare fino a circa 50 mL e lavato con HCl 2 M. Lo strato acquoso combinato è stato portato con NaOH a pH 8-9, estratto con EtOAc, e lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia ed essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Il solvente è stato rimosso a ottenere 600 mg di 1-(azetidino-3-il)-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina.

#### **Passaggio 4**

La miscela di 1-(azetidino-3-il)-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-4-ammina (80 mg, 0,210 mmol, acido 2-ciano-4-metil-pent-2-enoico (44,4 mg, 0,320 mmol), PyAOP (121,9 mg, 0,230 mmol) e TEA (0,09 mL, 0,640 mmol) in DCM (3 mL), è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. Il solvente è stato rimosso e il residuo è stato purificato su una piastra di gel di silice utilizzando 6:94 MeOH:CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> per ottenere 2-[3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]azetidina-1-carbonil]-4-metil-pent-2-enitrile (34 mg) sotto forma di una polvere bianca. LC-MS (ES, m/z): 498 [M+H].

#### **Esempio di riferimento 18**

Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-idrossipiperidin-1-il)-4-metilpent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

A una soluzione di 2-metilpropanale (0,82 mL, 9,0 mmol) in DCM (10 mL) raffreddata con un bagno di ghiaccio è stato aggiunto bromo (0,5 mL, 9,9 mmol) nel corso di un periodo di 10 minuti. 1,5 ore dopo, la reazione è stata concentrata fino a un peso di 1,4 g e poi nuovamente agitata in DCM (10 mL) a temperatura ambiente. A ciò è stato aggiunto piperidin-4-olo (1,82 g, 18,0 mmol) dissolto in DCM (7 mL). La reazione è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente e poi è stata diluita con DCM e lavata con NaHCO<sub>3</sub> acquoso e HCl 0,5 N. Lo strato acquoso acido è stato poi portato a pH = 12 con NaOH. Si è formato un ppt/olio bianco e successivamente lo strato acquoso è stato lavato con DCM. Lo strato organico è stato essiccato (MgSO<sub>4</sub>), filtrato e concentrato per raccogliere 0,49 g di 2-(4-idrossipiperidin-1-il)-2-metilpropanale sotto forma di un olio giallo.

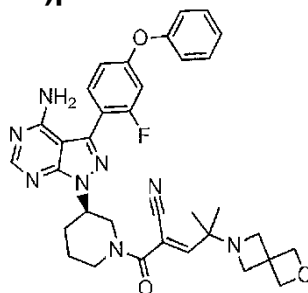
### **Passaggio 2**

Una miscela di (R)-3-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-3-ossopropannitrile (150 mg, 0,31 mmol), 2-(4-idrossi-1-piperidil)-2-metil-propanale (167 mg,

0,98 mmol), pirrolidina (0,03 mL, 0,31 mmol) e DCM (10 mL) è stata agitata a temperatura ambiente per 2 giorni e quindi diluita con NaHCO<sub>3</sub> acquoso (40 mL) ed estratta con DCM. L'organico è stato essiccato (MgSO<sub>4</sub>), filtrato e concentrato fino a diventare un olio. Il materiale grezzo è stato purificato a Isolera (25 g colonna: 30% iPrOH/DCM) per ottenere il prodotto che è stato isolato mediante liofilizzazione a fornire 61 mg (resa 32%) di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-idrossipiperidin-1-il)-4-metilpent-2-ennitrile sotto forma di una polvere. MS (ione pos.) m/z: 625 (M+1).

#### **Esempio di riferimento 19**

**Sintesi di 2-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbonil]-4-metil-4-(6-ossa-2-azaspiro[3.3]eptan-2-il)pent-2-ennitrile**



#### **Passaggio 1**

Ad una soluzione di 2-metilpropanale (5,6 mL, 61,8 mmol) in DCM (75 mL) raffreddata con un bagno di ghiaccio è stato aggiunto bromo (3,2 mL, 61,8 mmol) goccia a goccia. Dopo 1 ora, la soluzione risultante di 2-bromo-2-metilpropanale è stata fatta evaporare fino ad un peso di 8,5 g. Questo materiale è stato agitato in DCM (8 ml) a

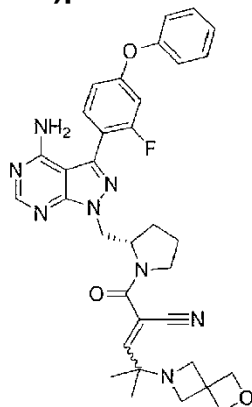
temperatura ambiente e si è aggiunto 6-ossa-2-azaspiro[3.3]eptano; 1/2 ossalato (1,57 mL, 7,19 mmol) insieme a TEA (10 mL) e MeOH (3 mL). Dopo aver agitato per 2 giorni la miscela è stata diluita con salamoia (30 mL) e gli strati sono stati separati. Lo strato organico è stato lavato con HCl 1 M (50 mL) e quindi lo strato acquoso è stato basificato con KOH a pH = 10-11. Questo è stato quindi estratto con DCM e gli strati organici sono stati combinati, essiccati ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrati e concentrati per isolare 2-metil-2-(6-ossa-2-azaspiro[3.3]eptan-2-il)propanale sotto forma di un olio utilizzato direttamente nella fase successiva.

### **Passaggio 2:**

Ad una miscela di (R)-3-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-3-ossopropannitrile (222 mg, 0,46 mmol), 2-metil-2-(6-ossa-2-azaspiro[3.3]eptan-2-il)propanale (231,17 mg, 1,37 mmol) e pirrolidina (0,23 mL, 2,73 mmol) in DCM (10 mL) a temperatura ambiente è stato aggiunto cloro(trimetil)silano (0,17 mL, 1,37 mmol). Dopo avere agitato 2 ore la soluzione è stata diluita con  $\text{NaHCO}_3$  saturo ed estratta con DCM. Gli strati organici sono stati combinati, essiccati ( $\text{MgSO}_4$ ), filtrati e concentrati. Il materiale grezzo è stato purificato mediante cromatografia per ottenere 133 mg di 2-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbonil]-4-metil-4-(6-ossa-2-azaspiro[3.3]eptan-2-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 623 (M+1).

### **Esempio di riferimento 19a**

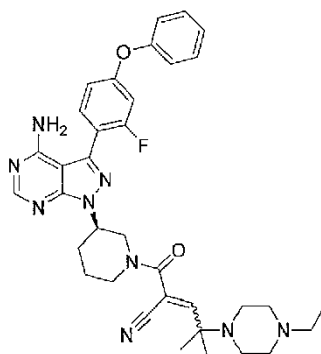
**Sintesi di (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4-metil-4-(2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptan-6-il)pent-2-enitrile**



Procedendo come sopra descritto ma sostituendo (S)-3-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidin-1-il)-3-ossopropannitrile al posto di (R)-3-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-3-ossopropannitrile si è ottenuto 2-[(2S)-2-[[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]metil]piperidina-1-carbonil]-4-metil-4-(6-ossa-2-azaspiro[3.3]eptan-2-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 623 (M+1).

**Esempio di riferimento 20**

**Sintesi di 2-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]-pirimidin-1-il]piperidina-1-carbonil]-4-(4-etilpiperazin-1-il)-4-metil-pent-2-enitrile**



### **Passaggio 1**

Ad una soluzione raffreddata (0 °C) di 2-bromo-2-metilpropanale (2504 mg, 16,58 mmol), preparata come nell'esempio 5, in 15 mL di DCM è stata aggiunta 1-etilpiperazina (2,53 mL, 19,9 mmol) e TEA (2,31 mL, 16,58 mmol) e la soluzione è stata agitata a temperatura ambiente per 24 ore. La miscela è stata sottoposta a work up con HCl 1 N (50 mL) e DCM (50 mL x 2). L'acquoso è stato basificato con KOH a pH ~ 11 e lavato con DCM (50 mL x 3). Gli strati organici sono stati lavati con sodio cloruro saturo, essiccati (MgSO<sub>4</sub>), e quindi concentrati per ottenere 2-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-propanale (resa 90%) sotto forma di un olio.

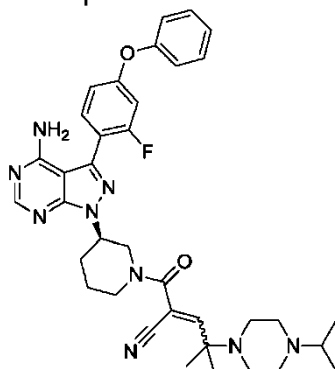
### **Passaggio 2**

Alla soluzione di 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidil]-3-osso-propannitrile (0,32 mL, 0,57 mmol) in DCM (20 mL), 2-(4-etilpiperazin-1-il)-2-metil-propanale (211,84 mg, 1,15 mmol) e pirrolidina (0,14 mL, 1,72 mmol) è stata agitata a temperatura ambiente per 10 minuti, quindi è stato aggiunto cloro(trimetil)silano (0,29 mL, 2,3 mmol). La miscela è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 18 ore. La miscela è stata

sottoposta a work up con NaHCO<sub>3</sub> saturo (50 mL) e DCM (50 mL x 2), lavata con sodio cloruro saturo, essiccata (MgSO<sub>4</sub>) e concentrata a dare un olio che è stato purificato su gel di silice (5%-50% iPA/DCM) per ottenere 2-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]piperidina-1-carbonil]-4-(4-etilpiperazin-1-il)-4-metil-pent-2-ennitrile 265 mg (resa 72,3%). MS (ione pos.) m/z: 638 (M+1).

### Esempio di riferimento 21

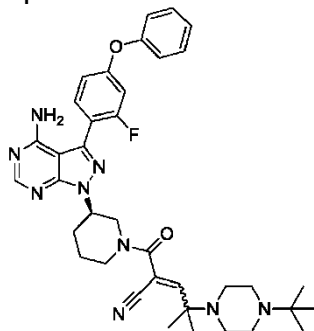
Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-isopropilpiperazin-1-il)-4-metilpent-2-ennitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo 1-isopropilpiperazina al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-isopropilpiperazin-1-il)-4-metilpent-2-ennitrile. MS (ione pos.) m/z: 653 (M+1).

### Esempio di riferimento 22

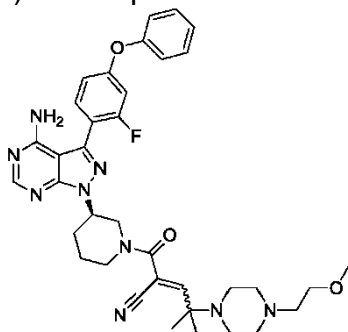
Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-(terz-butil)piperazin-1-il)-4-metilpent-2-ennitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo 1-(terz-butil)piperazina al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-(terz-butil)piperazin-1-il)-4-metilpent-2-ennitrile. MS (ione pos.) m/z: 668 (M+1).

### Esempio di riferimento 23

Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-(2-metossietil)piperazin-1-il)-4-metilpent-2-ennitrile

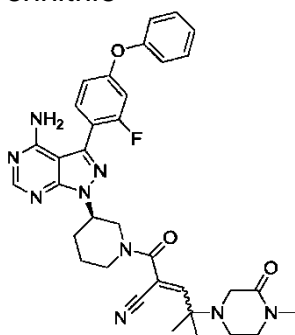


Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo 1-(2-metossietil)piperazina al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si

ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-(2-metossietil)piperazin-1-il)-4-metilpent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 668 (M+1).

#### **Esempio di riferimento 24**

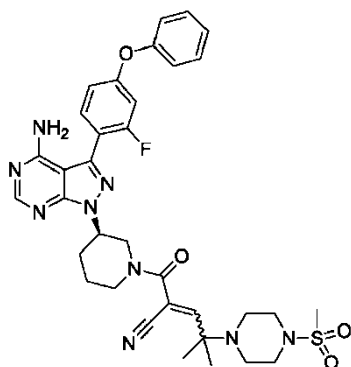
Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-metil-3-ossopiperazin-1-il)pent-2-enitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo 1-metilpiperazin-2-one al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-metil-3-ossopiperazin-1-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 638 (M+1).

#### **Esempio di riferimento 25**

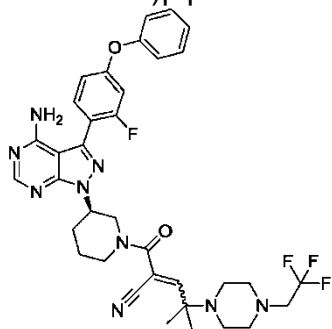
Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(metilsolfonil)piperazin-1-il)pent-2-enitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo 1-(metilsolfonil)piperazina al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(metilsolfonil)piperazin-1-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 688 (M+1).

#### Esempio di riferimento 26

Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazin-1-il)pent-2-enitrile

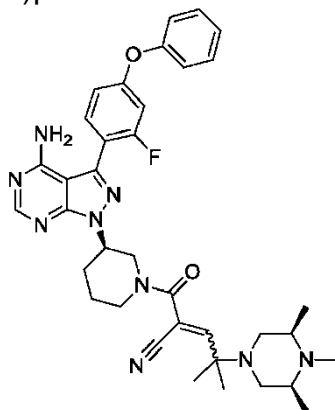


Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo 1-metil-4-(2,2,2-trifluoroetil)piperazina al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(2,2,2-

trifluoroetil)piperazin-1-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 692 (M+1).

#### **Esempio di riferimento 27**

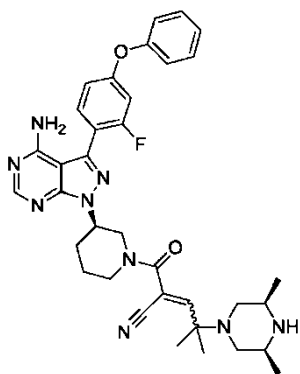
Sintesi di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-((3S,5R)-3,4,5-trimetilpiperazin-1-il)pent-2-enitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo (2S,6R)-1,2,6-trimetilpiperazina al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si ottiene 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-((3S,5R)-3,4,5-trimetil-piperazin-1-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 652 (M+1).

#### **Esempio di riferimento 28**

Sintesi di 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((3S,5R)-3,5-dimetilpiperazin-1-il)-4-metilpent-2-enitrile



### **Passaggi 1 e 2**

Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo (2S,6R)-terz-butil 2,6-dimetilpiperazina-1-carbossilato al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si ottiene (2S,6R)-terz-butil 4-(5-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-ciano-2-metil-5-ossopent-3-en-2-il)-2,6-dimetilpiperazina-1-carbossilato.

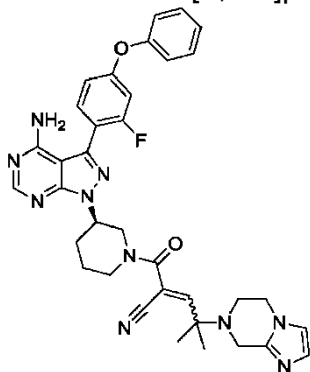
### **Passaggio 3**

Il (2S,6R)-terz-butil 4-(5-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-ciano-2-metil-5-ossopent-3-en-2-il)-2,6-dimetilpiperazina-1-carbossilato (103,5mg, 0,1400 mmol) è stato dissolto in HCl 4 N in diossano, e agitato a temperatura ambiente per 3 ore. Il solvente è stato rimosso e 2 mL di MeOH sono stati aggiunti ai residui. La miscela è stata neutralizzata a pH circa 7-8 ed estratta con DCM. Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia, essiccato su solfato di sodio, filtrato, e il solvente è stato fatto evaporare per ottenere prodotto puro 2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-

d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((3S,5R)-3,5-dimetilpiperazin-1-il)-4-metilpent-2-enitrile sotto forma di un solido bianco. MS (ione pos.) m/z: 638 (M+1).

### Esempio 29

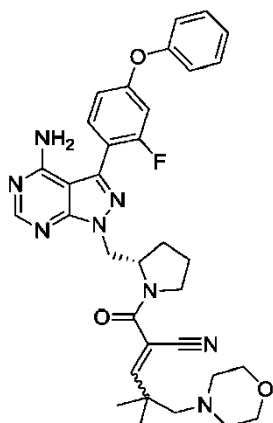
Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(5,6-diidroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)-4-metilpent-2-enitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 20 ma sostituendo 5,6,7,8-tetraidroimidazo[1,2-a]pirazina al posto di 1-etilpiperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(5,6-diidroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)-4-metilpent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 647 (M+1).

### Esempio di riferimento 30

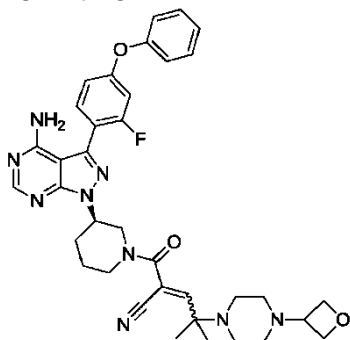
Sintesi di (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4,4-dimetil-5-morfolinopent-2-enitrile



Procedendo come nell'esempio 5, passaggio 2, ma sostituendo 2,2-dimetil-3-morfolino-propanale al posto di 2-metil-2-(pirrolidin-1-il)propanale, fornisce (S)-2-(2-((4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)metil)pirrolidina-1-carbonil)-4,4-dimetil-5-morfolinopent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 625 (M+1).

### **Esempio 31**

Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

Una soluzione di 2-bromo-2-metil-propanale (696,6 mg, 4,61 mmol) in DCM (10 mL) è stata raffreddata con un bagno di ghiaccio e 1-

(ossetan-3-il)piperazina (328 mg, 2,31 mmol), diluita con 5-10 mL di DCM è stata aggiunta lentamente mediante un imbuto gocciolatore nel corso di un periodo di 15 minuti. Successivamente è stata aggiunta base di Hunig (0,4 mL, 2,31 mmol) e quindi è stato rimosso il bagno di raffreddamento. La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per tutta la notte e lo strato di DCM è stato lavato tre volte con HCl 0,5 N. Lo strato acquoso combinato è stato neutralizzato con NaOH a pH 10-11 ed estratto con DCM. Lo strato organico combinato è stato lavato con salamoia ed essiccato su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La filtrazione e la rimozione del solvente hanno prodotto 2-metil-2-[4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il]propanale sotto forma di un liquido giallo chiaro, che è stato direttamente utilizzato nel passaggio successivo senza ulteriore purificazione.

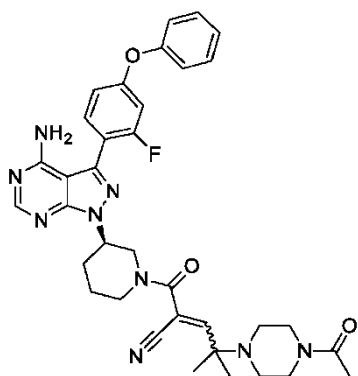
### **Passaggio 2**

A una soluzione raffreddata (0 °C) di 3-[(3R)-3-[4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossi-fenil)-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il]-1-piperidil]-3-ossopropannitrile (80 mg, 0,17 mmol), è stata aggiunta 2-metil-2-[4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il]propanale (~108 mg, 0,51 mmol) in DCM (10 mL) seguita da pirrolidina (0,08 mL, 1,02 mmol) e TMS-Cl (0,09 mL, 0,68 mmol.) Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la reazione agitata per 1 ora. La maggior parte del solvente è stata rimossa e i residui sono stati purificati mediante cromatografia, utilizzando 95:5 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH per ottenere 79 mg di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]-pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-

3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile sotto forma di un solido bianco. MS (ione pos.) m/z: 666 (M+1).

### **Esempio di riferimento 32**

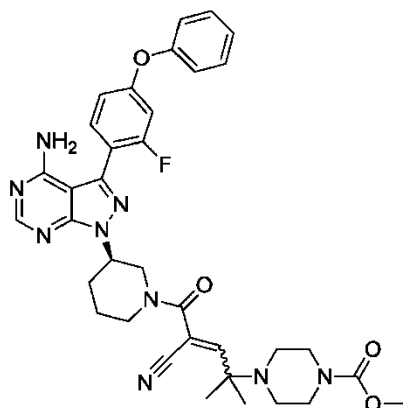
Sintesi di (R)-4-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metilpent-2-enitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 31 ma sostituendo 1-(piperazin-1-il)etanone al posto di 1-(ossetan-3-il)piperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-4-(4-acetilpiperazin-1-il)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metilpent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 652 (M+1).

### **Esempio di riferimento 33**

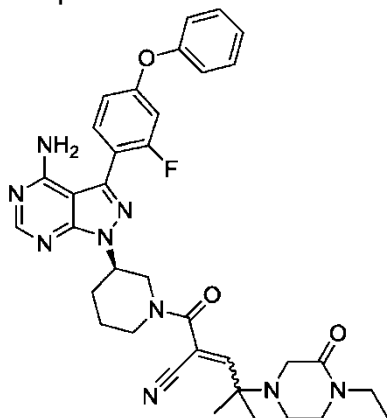
Sintesi di (R)-metil 4-(5-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-ciano-2-metil-5-ossopent-3-en-2-il)piperazina-1-carbossilato



Procedendo come sopra nell'esempio 31 ma sostituendo metil piperazina-1-carbossilato al posto di 1-(ossetan-3-il)piperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-metil 4-(5-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-ciano-2-metil-5-ossopent-3-en-2-il)piperazina-1-carbossilato. MS (ione pos.) m/z: 668 (M+1).

### **Esempio di riferimento 34**

Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-etil-3-ossopiperazin-1-il)-4-metilpent-2-enitrile



### **Passaggio 1**

A uno slurry di *terz*-butil 3-ossopiperazina-1-carbossilato (10 g, 49,9 mmol) in 250 mL di DMF, è stato aggiunto in porzioni NaH (60% in olio minerale) (2,1 g, 52,4 mmol). La miscela è stata agitata per 15 minuti dopo il completamento dell'aggiunta, raffreddata a 0 °C e si è aggiunto lentamente iodoetano (5,62 mL, 69,92 mmol) nel corso di ~3 minuti. La sospensione risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 2 ore. È stata aggiunta lentamente acqua (400 mL) e successivamente 250 mL di 1:1 etil acetato:dietil etere. Gli strati sono stati separati e successivamente la fase organica è stata lavata con salamoia, essiccata su solfato di sodio, filtrata e concentrata a dare *terz*-butil 4-etil-3-ossopiperazina-1-carbossilato sotto forma di un olio incolore del peso di 6,4 g, che è stato direttamente utilizzato nel passaggio successivo.

### **Passaggio 2**

A una soluzione di *terz*-butil 4-etil-3-osso-piperazina-1-carbossilato (4,5 g, 19,9 mmol) in 1,4-diossano (10 mL) sono stati aggiunti 10 mL di 4,0 M HCl/diossano. Dopo aver agitato 1 ora a temperatura ambiente, sono stati aggiunti ulteriori 5 mL di HCl in diossano e qualche mL di MeOH. La reazione è stata agitata per un'altra ora e quindi concentrata sotto pressione ridotta. È stato aggiunto diclorometano e il solvente è stato rimosso per ottenere il prodotto sotto forma di una schiuma del peso di 2,2 g. Questo è stato separato tra diclorometano e carbonato di sodio acquoso. La fase

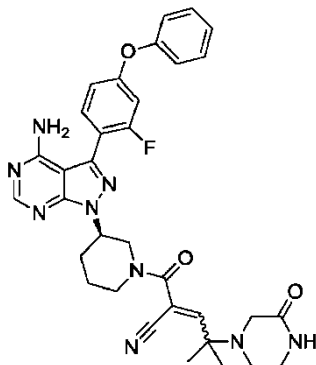
organica è stata lavata con acqua, essiccata su solfato di sodio, filtrata e concentrata a dare 1-etilpiperazin-2-one sotto forma di una schiuma.

#### **Passaggi 3 e 4**

Procedendo come nell'esempio 31 ma sostituendo 1-etilpiperazin-2-one al posto di 1-(ossetan-3-il)piperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(4-etil-3-ossopiperazin-1-il)-4-metilpent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 652 (M+1).

#### **Esempio di riferimento 35**

Sintesi di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(3-ossopiperazin-1-il)pent-2-enitrile



Procedendo come sopra nell'esempio 31 ma sostituendo piperazin-2-one al posto di 1-(ossetan-3-il)piperazina nel passaggio 1, si ottiene (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(3-ossopiperazin-1-il)pent-2-enitrile. MS (ione pos.) m/z: 624 (M+1).

## Esempi biologici

### Esempio 1

#### Saggio di attività enzimatica di Btk

Si è utilizzato un saggio chinasiico basato su Caliper (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA) per misurare l'inibizione della attività chinasiica di Btk da parte di un composto della presente divulgazione. Diluizioni seriali di composti di test sono state incubate con Btk umana ricombinante (0,5 nM), ATP (16  $\mu$ M) e un substrato peptidico fosfoaccettore FAM-GEEPLYWSFPAKKK-NH<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) a temperatura ambiente per 3 ore. La reazione è stata quindi terminata con EDTA, concentrazione finale di 20 mM, e il prodotto di reazione fosforilato è stato quantificato su un Caliper Desktop Profiler (Caliper LabChip 3000). L'inibizione percentuale è stata calcolata per ciascuna diluizione del composto ed è stata calcolata la concentrazione che ha prodotto un'inibizione del 50%. Tale valore è presentato come la IC<sub>50</sub>. Le IC<sub>50</sub> per alcuni composti della divulgazione sono indicate di seguito.

| Composto<br>sintetico n. | nell'esempio | IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ m) | Composto<br>sintetico n. | nell'esempio | IC <sub>50</sub><br>( $\mu$ m) |
|--------------------------|--------------|--------------------------------|--------------------------|--------------|--------------------------------|
|                          | 1            | 0,0031                         |                          | 9            | 0,0047                         |
|                          | 2            | 0,0041                         |                          | 10           | 0,0021                         |
|                          | 3            | 0,0081                         |                          | 11           | 0,0161                         |
|                          | 4            | 0,0003                         |                          | 12           | 0,004                          |
|                          | 5            | 0,0019                         |                          | 13           | 0,0006                         |

|     |        |     |        |
|-----|--------|-----|--------|
| 6   | 0,0004 | 14  | 0,0204 |
| 7   | 0,0009 | 15  | 0,0041 |
| 8   | 0,0038 | 18  | 0,0007 |
| 19  | 0,0015 | 8A  | 0,0009 |
| 13a | 0,0009 | 13b | 0,026  |
| 19a | 0,0056 | 20  | 0,0009 |
| 21  | 0,0007 | 22  | 0,0006 |
| 23  | 0,001  | 24  | 0,0012 |
| 25  | 0,0014 | 30  | 0,0052 |
| 31  | 0,0015 | 33  | 0,0020 |
| 32  | 0,0019 | 34  | 0,0013 |
| 35  | 0,0013 |     |        |

## **Esempio 2**

### **Misura del coinvolgimento di BTK nella linea cellulare B**

#### **Ramos umana**

La potenza dei composti relativamente all'inibizione dell'attività di BTK può essere valutata dal legame dei composti al bersaglio in cellule B Ramos umane che contengono BTK. L'entità dell'occupazione di BTK è misurata dopo il trattamento delle cellule con i composti e la rivelazione della BTK non occupata mediante legame con N-(2-(4-((E)-

4-((R)-3-(4-ammino-3-(4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidin-1-il)-4-ossobut-2-en-1-il)piperazin-1-il)etil)-6-(6-(5-(2-ossosaidro-1H-tieno[3,4-d]imidazol-4-il)pentanamido)esanammido)esanammide come sonda.

In breve, cellule Ramos sono state aggiunte a piastre da 96 pozzetti ad una densità di  $10^6$  cellule per pozzetto. Sono state aggiunte diluizioni seriali dei composti la cui potenza doveva essere testata in modo tale che le concentrazioni finali iniziassero a  $1 \mu\text{M}$  e sono state diluite in maniera seriale 3 volte per un totale di 8 diluizioni seriali. La concentrazione finale di DMSO era dello 0,09% in ciascun pozzetto. I composti sono stati lasciati interagire con le cellule per 1 ora. Si è quindi aggiunta una sonda selettiva per BTK a ciascun pozzetto ad una concentrazione finale di 330 nM. Il trattamento con la sonda è durato 1 ora. Le cellule sono state quindi raccolte mediante centrifugazione e lisate per 15 - 30 minuti su ghiaccio. Il legame della sonda con BTK è stato quindi rivelato mediante Alphascreen (Perkin Elmer) utilizzando un kit per la specifica etichetta sulla sonda per BTK. L'occupazione percentuale di BTK a ciascuna concentrazione di composto è stata quindi calcolata sulla base della rivelazione di BTK non occupata legata alla sonda con etichetta. L'occupazione di BTK è stata quindi rappresentata in grafico come funzione del log della concentrazione del composto e sono stati calcolati i valori di  $\text{IC}_{50}$ . Il saggio per misurare l'occupazione di BTK è stato modificato per misurare la durata del legame di BTK nelle cellule rimuovendo il composto dal terreno di

coltura e incubando le cellule per vari periodi di tempo, seguiti dalla misura dell'occupazione rimanente nel modo sopra descritto. Per le misure di durata, l'intervallo di occupazione per i composti qui divulgati (tranne che per i composti divulgati negli esempi n. 9, 14, 15, 3, 16, 17, 10a, 13b, 30, 22 e 26) dopo 18 ore di lavaggio era circa del 3 - 80%.

### **Esempio 3**

#### **Blocco dell'espressione di CD69 in campioni umani di sangue intero**

L'attivazione del recettore delle cellule B porta all'incremento dell'attività di BTK, alla mobilizzazione del calcio e all'attivazione delle cellule B (si veda Honigberg L.A., et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 107:13075-80. 2010). È stato mostrato che gli inibitori di BTK bloccano l'attivazione delle cellule B misurata dall'espressione di CD69 (si veda Karp, R., et. al., Inhibition of BTK with AVL-292 Translates to Protective Activity in Animal Models of Rheumatoid Arthritis. Inflammation Research Association Meeting, settembre 2010). CD69 è stato espresso a seguito dell'attivazione delle cellule B come misura dell'attività di BTK nel sangue intero. Aliquote di sangue intero sono state pre-incubate con diluizioni seriali del composto di test per 30 minuti, seguiti dall'attivazione con anti-IgM (Fab'2 di capra, 50 µg/ml). I campioni sono stati incubati per una notte a 37° C e quindi sottoposti a collaborazione con anti-CD20 con etichetta PE e anti-CD69 con etichetta APC (BD Pharmingen) per 30 minuti, secondo le indicazioni del produttore. Il sangue intero è stato quindi lisato e le cellule

selezionate per l'espressione di CD20 sono state quantificate per l'espressione di CD 69 mediante FACS. L'inibizione percentuale è stata calcolata sulla base di un controllo di DMSO per l'assenza di inibizione ed è stata rappresentata in grafico come funzione della concentrazione del composto di test, da cui è stato calcolato un valore di IC<sub>50</sub>. L'intervallo di valori di IC<sub>50</sub> per i composti qui divulgati (tranne che per i composti divulgati negli esempi n. 2, 5, 17, 13b, 30 e 22) era di circa 1,4 - 0,08 µM.

#### **Esempio 4**

##### **Inibizione dell'artrite indotta da collagene nel topo**

L'inibizione dell'artrite indotta da collagene murina (mCIA) rappresenta un modello animale di malattia standard per l'artrite reumatoide. Studi precedenti hanno dimostrato che l'inibizione di BTK è efficace nel bloccare la mCIA (si veda Honigberg L.A., et. al., Proc Natl Acad Sci U S A. 107:13075-80. 2010). Iniziando dal giorno 0, si inietta a topi DBA/1 un'emulsione di collagene tipo II in adiuvante completo di Freund. I topi sono stati sottoposti a richiamo 21 giorni dopo per sincronizzare lo sviluppo della malattia. Dopo lo sviluppo di malattia lieve gli animali sono stati inseriti nello studio e randomizzati. Il dosaggio è orale, una volta al giorno, tipicamente per 11 giorni con composto di test oppure desametasone (0,2 mg/kg) come controllo. Un gruppo riceve solamente il veicolo. Il punteggio clinico (0 - 4) è basato sull'entità del gonfiore e sulla gravità dell'artrite. I punteggi per tutte e quattro le zampe vengono sommati dando un punteggio massimo di 16.

Gli anticorpi anti-collagene e le Ig totali sono misurati per ciascun animale mediante Elisa alla fine dello studio (Bolder BioPath, Boulder, CO).

### **Esempio 5**

#### **Recupero dell'attività chinasica dopo dialisi per valutare il legame covalente irreversibile rispetto al reversibile**

Un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione ad una concentrazione 10 volte superiore al suo valore di  $IC_{50}$  è stato aggiunto ad una soluzione di protein chinasasi (5 nM) in un tampone contenente Hepes 20 mM [pH 7,5],  $MgCl_2$  5 mM, Triton X-100 0,01%, e ditiotreitolo 1 mM. Dopo 60 minuti a 22° C, le reazioni sono state trasferite in una cassetta di dialisi (0,1-0,5 mL Slide-A-Lyzer, MWCO 10 kDa, Pierce) e dializzate contro 1 L di tampone (Hepes 20 mM [pH 7,5],  $MgCl_2$  5 mM, Triton X-100 0,01%, e ditiotreitolo 1 mM) a 22° C. Il tampone di dialisi è stato cambiato due volte al giorno fino alla fine dell'esperimento. Aliquote sono state prelevate dalla cassetta di dialisi ogni 24 ore e sottoposte ad analisi per la determinazione dell'attività protein chinasica. L'attività chinasica per ciascun campione è stata normalizzata al controllo di DMSO per quel punto temporale ed espressa come la media  $\pm$  SD.

Risultati: Attività chinasica recuperata dall'inibizione da parte dei composti della presente divulgazione dopo dialisi. Dopo lunga dialisi a temperatura ambiente l'attività chinasica era recuperata parzialmente

o completamente in maniera indipendente dal tempo dall'inibizione effettuata da un eccesso di composti della presente divulgazione.

### **Esempio 6**

#### **Analisi di spettrometria di massa**

Una protein chinasi che è inibita da un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione può essere sottoposta ad analisi di spettrometria di massa per valutare la formazione di addotti covalenti irreversibili permanenti. Sono generalmente noti nell'arte metodi analitici idonei ad esaminare l'intera proteina intatta o frammenti peptidici generati dopo clivaggio tripsinico della protein chinasi. Tali metodi identificano addotti proteici covalenti, irreversibili, permanenti osservando un picco di massa che corrisponde alla massa di un campione di controllo più la massa di un addotto irreversibile. Due di tali metodi sono descritti di seguito. Analisi di spettrometria di massa di chinasi intera intatta.

#### **Metodo:**

Una protein chinasi (5  $\mu\text{M}$ ) è incubata con un composto della presente divulgazione (25  $\mu\text{M}$ , 5 equiv) per 1 ora a temperatura ambiente in tampone (Hepes 20 mM [pH 8,0], NaCl 100 mM,  $\text{MgCl}_2$  10 mM). Viene anche preparato un campione di controllo che non contiene un composto della presente divulgazione. La reazione viene interrotta aggiungendo un eguale volume di acido formico 0,4%, e i campioni sono analizzati mediante cromatografia liquida (colonna per proteine Microtrap C18 [Michrom Bioresources], MeCN 5%, acido formico 0,2%,

0,25 mL/min; eluizione con 95% MeCN, 0,2% acido formico) e spettrometria di massa ESI in linea (LCT Premier, Waters). Le masse molecolari della proteina chinasi e di qualsiasi addotto possono essere determinate con il software di deconvoluzione MassLynx.

Risultati: L'analisi di spettrometria di massa intatta ad alta risoluzione di una chinasi che è inibita da un composto della presente divulgazione rivelerà uno spettro simile a quello della chinasi in assenza di inibitore (ad esempio di campione di controllo). Non ci sarà formazione nello spettro di massa di un nuovo picco corrispondente alla massa molecolare della chinasi più la massa molecolare del composto di formula I. Sulla base di questo esperimento, nel modo in cui può essere applicato a un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile qui divulgato, nessuno addotto proteico, irreversibile, permanente risulterà evidente ad un tecnico del ramo.

### **Analisi di spettrometria di massa di digerito tripsinico di chinasi**

#### **Metodo:**

Una proteina (10-100 pmoli) è incubata con un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione (100-1000 pmoli, 10 equiv) per 3 ore prima della digestione tripsinica. Si può utilizzare iodoacetammide come agente alchilante dopo l'incubazione con il composto. Viene anche preparato un campione di controllo che non utilizza il composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione. Per i digeriti tripsinici un'aliquota da 1 µl (3,3

pmoli) è diluita con 10 µl di TFA 0,1% prima di versare mediante micro C18 Zip Tipping direttamente sul bersaglio MALDI utilizzando acido alfa ciano-4-idrossi cinnamico come matrice di desorbimento (5 mg/mol in TFA 0,1%:acetonitrile 50:50) o acido sinapinico come matrice di desorbimento (10 mg/mol in TFA 0,1%:acetonitrile 50:50).

Risultati: L'analisi di spettrometria di massa ad alta risoluzione dei frammenti tripsinici di una chinasi che è inibita da un composto e/o sale farmaceuticamente accettabile della presente divulgazione rivelerà uno spettro simile a quello della chinasi in assenza di inibitore (ad esempio di campione di controllo). Non risulterà alcuna evidenza di alcun peptide modificato che non è presente nel campione di controllo. Sulla base di questo esperimento nessun addotto proteico irreversibile permanente risulterà evidente ad un tecnico del ramo.

Sono anche facoltativamente utilizzati saggi cellulari per valutare le proprietà inibitorie di un composto della presente divulgazione. I saggi cellulari includono cellule provenienti da qualsiasi fonte appropriata, incluse cellule vegetali e animali (come cellule di mammifero). I saggi cellulari sono anche facoltativamente condotti su cellule umane. Saggi cellulari sull'inibizione di BTK sono ben noti nell'arte, e includono metodi in cui viene immesso un inibitore nella cellula (ad esempio mediante elettroporazione, diffusione passiva, microiniezione e simili) e si misura un endpoint di attività, come la quantità di fosforilazione di un substrato cellulare, la quantità di espressione di una proteina cellulare, o qualche altro cambiamento nel

fenotipo cellulare che si sa essere influenzato dall'attività catalitica di BTK. Ad esempio, la fosforilazione di un particolare substrato cellulare è facoltativamente valutata utilizzando un anticorpo di rivelazione specifico per il substrato cellulare fosforilato, seguito da tecniche di western blotting e visualizzazione utilizzando qualsiasi mezzo appropriato (ad esempio la rivelazione di fluorescenza di un anticorpo marcato in modo fluorescente).

La misura della riduzione dell'attività catalitica di BTK in presenza della presente divulgazione rispetto all'attività in assenza della presente divulgazione viene facoltativamente eseguita utilizzando una varietà di metodi noti nell'arte, come i saggi descritti nella sezione di esempi seguente. Nell'arte sono noti altri metodi per saggiare l'attività di BTK.

### **Esempio 7**

#### **Determinazione del tempo di permanenza farmaco-chinasi**

Il seguente è un protocollo che può essere utilizzato per distinguere se un composto mostra una velocità di dissociazione da BTK lenta o inesistente, come si verificherebbe caratteristicamente se viene formato un legame covalente tra il composto e il bersaglio. La lettura per una dissociazione lenta è la capacità del composto di interesse di bloccare il legame di una molecola di tracciante fluorescente ad elevata affinità con il sito attivo della chinasi, rilevata utilizzando il trasferimento di energia per risonanza di fluorescenza risolto nel tempo (TR-FRET). L'esperimento è stato condotto in un

tampone costituito da HEPES 50 mM pH 7,5, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, Triton X-100 0,01%, e EGTA 1 mM.

La prima fase della procedura è stata l'incubazione di BTK 500 nM (Invitrogen n. cat. PV3587) con 1,5 µM di un composto della presente divulgazione per 30 minuti in un volume di 10 µL. La miscela è stata quindi diluita di 5 volte mediante l'aggiunta di 40 µL di tampone. Un volume di 10 µL della soluzione chinasi/composto diluita è stato quindi aggiunto a un pozzetto di una piastra da 384 pozzetti di piccolo volume (come la Greiner n. cat. 784076). Per sondare la reversibilità dell'interazione di legame chinasi/composto è stata preparata una soluzione di competizione contenente sia un tracciante fluorescente ad elevata affinità che un anticorpo accoppiato a europio. Per la BTK, la soluzione di competizione conteneva tracciante 178 1,5 µM (Invitrogen n. cat. PV5593), che è un legando ad elevata affinità per BTK di proprietà privata accoppiato al fluoroforo AlexaFluor 647. La soluzione di competizione conteneva anche 80 nM di un anticorpo anti-polistidina accoppiato a europio (Invitrogen n. cat. PV5596) che è progettato per legare l'etichetta di purificazione di polistidina in BTK.

Dopo l'aggiunta di 10 µL della soluzione di competizione alla piastra Greiner, la miscela è stata incubata per un'ora o più a lungo per lasciare il tempo per la dissociazione di inibitori non covalenti ed il legame del tracciante ad elevata affinità. Ci si aspetta che inibitori covalenti e a lenta dissociazione blocchino il legame del tracciante, mentre gli inibitori non covalenti a dissociazione rapida non lo faranno.

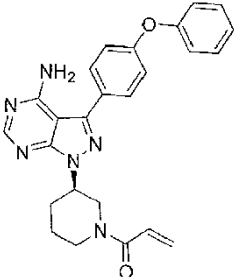
Il legame del tracciatore con BTK viene rivelato utilizzando TR-FRET tra la porzione di europio dell'anticorpo anti-istidina e il gruppo AlexaFluor 647 del tracciatore 178. Il legame è stato valutato utilizzando uno strumento Perkin Elmer Envision (modello 2101) dotato di filtri e specchi compatibili con esperimenti TR-FRET tipo LANCE. I dati sono stati posti in grafico come percentuale del segnale ottenuto in assenza di composto competitivo. Il segnale di fondo è stato ottenuto mediante omissione di BTK dalla reazione. Se il composto è un inibitore covalente irreversibile, il legame del tracciatore con il bersaglio verrà completamente bloccato per l'intero corso dell'esperimento. Se il composto è un inibitore covalente reversibile, il tracciatore si legherà al bersaglio poiché il composto si dissocia dal bersaglio.

### **Esempio 8**

#### **Reversibilità di legame**

Il seguente approccio è stato sviluppato per differenziare i composti che formano un legame covalente irreversibile con i loro bersagli, come composti acrilammidici non contenenti ciano, da composti che formano un legame covalente reversibile, ossia composti e/o sali farmaceuticamente accettabili della presente divulgazione. Le reazioni sono state preparate con il bersaglio proteico ad una concentrazione più elevata dei composti di interesse. I composti covalenti sia irreversibili che reversibili si sono legati al bersaglio e sono diminuiti nella soluzione. Le reazioni sono quindi state trattate con perturbazioni, includenti sia la denaturazione con guanidina cloridrato 5

M sia la digestione con tripsina, rompendo il corretto ripiegamento del bersaglio. Si è trovato che le perturbazioni riportavano i composti covalenti reversibili in soluzione a causa della dissociazione dal bersaglio, mentre i composti covalenti irreversibili rimanevano legati al bersaglio. La concentrazione del composto in soluzione è stata valutata sia prima che dopo la perturbazione utilizzando cromatografia liquida ad alta prestazione (HPLC) accoppiata a spettrometria di massa tandem. Utilizzando questa tecnica è stato dimostrato che un composto covalente irreversibile diminuisce nella soluzione sia nello stato nativo che perturbato, mentre i composti e/o sali farmaceuticamente accettabili qui divulgati risultavano diminuiti nello stato ripiegato ma ritornavano in soluzione a seguito di perturbazione del bersaglio, evidenziando che i composti e/o sali farmaceuticamente accettabili qui divulgati formano un legame covalente reversibile.

| Composto                                                                            | Composto in soluzione nello stato nativo? | Composto in soluzione nello stato denaturato o digerito? |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
|  | no                                        | no                                                       |
| (Inibitore irreversibile)                                                           |                                           |                                                          |

|          |                                           |                                                          |
|----------|-------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Composto | Composto in soluzione nello stato nativo? | Composto in soluzione nello stato denaturato o digerito? |
| 10       | no                                        | sì                                                       |

### **Esempi di formulazione**

Le seguenti sono formulazioni farmaceutiche rappresentative contenenti un composto qui divulgato.

#### **Composizione parenterale**

Per preparare una composizione farmaceutica parenterale adatta per la somministrazione mediante iniezione, 100 mg di un sale idrosolubile di un composto qui divulgato sono dissolti in HPMC 2%, Tween 80 1% in acqua deionizzata, pH 2,2 con MSA, quanto basta fino ad almeno 20 mg/mL. La miscela è incorporata in una forma unitaria di dosaggio adatta per la somministrazione mediante iniezione.

#### **Composizione orale**

Per preparare una composizione farmaceutica per la somministrazione orale, 400 mg di un composto quindi divulgato e i seguenti ingredienti sono intimamente miscelati e pressati in compresse con singola incisione.

#### **Formulazione in compressa**

I seguenti ingredienti sono intimamente miscelati e pressati in compresse con singola incisione.

| Ingrediente | Quantità per compressa mg |
|-------------|---------------------------|
|-------------|---------------------------|

| Ingrediente                     | Quantità per compressa mg |
|---------------------------------|---------------------------|
| composto di questa divulgazione | 400                       |
| amido di mais                   | 50                        |
| croscarmellosa sodica           | 25                        |
| lattosio                        | 120                       |
| stearato di magnesio            | 5                         |

#### **Formulazione in capsula**

I seguenti ingredienti sono stati intimamente miscelati e caricati in una capsula di gelatina a guscio duro.

| Ingrediente                             | Quantità per capsula mg |
|-----------------------------------------|-------------------------|
| composto di questa divulgazione         | 200                     |
| lattosio essiccato mediante spruzzatura | 148                     |
| stearato di magnesio                    | 2                       |

#### **Composizione per inalazione**

Per preparare una composizione farmaceutica per somministrazione mediante inalazione 20 mg di un composto qui divulgato sono miscelati con 50 mg di acido citrico anidro e 100 mL di una soluzione di sodio cloruro 0,9%. La miscela è incorporata in una unità per somministrazione mediante inalazione, come un nebulizzatore, che è adatto per la somministrazione mediante inalazione.

#### **Composizione gel topica**

Per preparare una composizione gel topica farmaceutica, 100 mg di un composto qui divulgato sono miscelati con 1,75 g di idrossipropil cellulosa, 10 mL di glicole propilenico, 10 mL di isopropil miristato e 100 mL alcol purificato USP. La miscela gel risultante è quindi incorporata in contenitori, come tubi, che sono adatti per la somministrazione topica.

### **Composizione di soluzione oftalmica**

Per preparare una composizione di soluzione oftalmica farmaceutica, 100 mg di un composto qui divulgato sono miscelati con 0,9 g di NaCl in 100 mL di acqua purificata e filtrati utilizzando un filtro da 0,2 micron. La risultante soluzione isotonica è quindi incorporata in unità di somministrazione oftalmica, come contenitori per gocce oftalmiche, che sono adatti per la somministrazione oftalmica.

### **Soluzione di spray nasale**

Per preparare una soluzione di spray nasale farmaceutica, 10 g di un composto qui divulgato sono miscelati con 30 mL di una soluzione di tampone fosfato 0,05 M (pH 4,4). La soluzione è posta in un somministratore nasale progettato per somministrare 100 µl di spray per ciascuna applicazione.

## Rivendicazioni

1. Composto e/o suo sale farmaceuticamente accettabile, in cui il composto è scelto tra:

(R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile;

(S)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile;

2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((R)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

2-((S)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((R)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

2-((R)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((S)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

2-((S)-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-((S)-esaidropirazino[2,1-c][1,4]ossazin-8(1H)-il)-4-metilpent-2-enitrile;

(R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(5,6-diidroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)-4-metilpent-2-enitrile; e

(S)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-(5,6-diidroimidazo[1,2-a]pirazin-7(8H)-il)-4-metilpent-2-enitrile,

o una miscela di loro isomeri R e S; oppure

un isomero (E) o (Z) di uno qualsiasi dei precedenti composti.

**2.** Composto e/o suo sale farmaceuticamente accettabile secondo la rivendicazione 1, in cui il composto è:

(R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile;

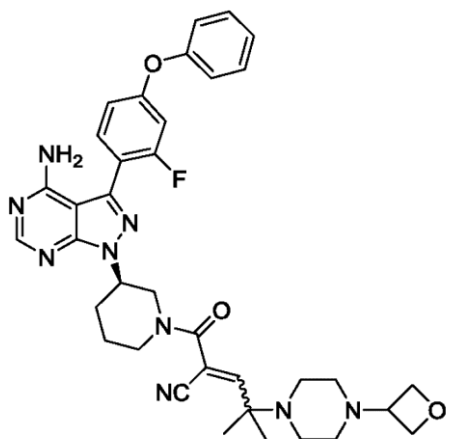
(S)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile; oppure

una miscela di (R)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile e (S)-2-(3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile;

oppure un singolo isomero (E) o (Z) di uno qualsiasi dei precedenti composti.

**3.** Composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile secondo la rivendicazione 1, in cui il composto è una miscela di isomero (E) e isomero (Z) di (R)-2-3-(4-ammino-3-(2-fluoro-4-

fenossifenil)-1H-pirazolo[3,4-d]pirimidin-1-il)piperidina-1-carbonil)-4-metil-4-(4-(ossetan-3-il)piperazin-1-il)pent-2-enitrile avente la struttura:



**4. Composizione farmaceutica comprendente:**

un composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3; e

un eccipiente farmaceuticamente accettabile;

preferibilmente un composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile secondo la rivendicazione 2 o 3, e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

**5. Composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 4, in cui la composizione farmaceutica è una formulazione con rivestimento enterico o a rilascio ritardato.**

**6. Composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3 per l'uso nel trattamento di una malattia scelta tra malattie autoimmuni, malattie o condizioni eteroimmuni, malattie infiammatorie e cancro, preferibilmente un composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile secondo la**

rivendicazione 2 o 3 per l'uso nel trattamento di una malattia scelta tra malattie autoimmuni, malattie o condizioni eteroimmuni, malattie infiammatorie e cancri.

7. Composto e/o suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 6 in cui la malattia è scelta tra malattie autoimmuni, malattie o condizioni eteroimmuni, e malattie infiammatorie, in cui:

la malattia autoimmune è scelta tra infiammatoria intestinale, colite ulcerosa, artrite, lupus, artrite reumatoide, artrite psoriasica, osteoartrite, malattia di Still, artrite giovanile, diabete, miastenia gravis, tiroidite di Hashimoto, tiroidite di Ord, malattia di Graves, sindrome di Sjogren, occhio secco di Sjogren, malattia dell'occhio secco non Sjogren, sclerosi multipla, sindrome di Guillain-Barre, encefalomielite acuta disseminata, malattia di Addison, sindrome dell'opsoclonomiocloni, spondilite anchilosante, sindrome da anticorpi antifosfolipidi, anemia aplastica, epatite autoimmune, celiachia, sindrome di Goodpasture, porpora trombocitopenica idiopatica, neurite ottica, sclerodermia, cirrosi biliare primitiva, sindrome di Reiter, arterite di Takayasu, arterite temporale, anemia emolitica autoimmune da anticorpi caldi, granulomatosi di Wegener, psoriasi, alopecia universalis, sindrome di Behcet, stanchezza cronica, disautonomia, endometriosi, cistite interstiziale, neuromiotonia, sclerodermia, e vulvodinia; la malattia o condizione eteroimmune è scelta tra malattia del trapianto verso l'ospite, trapianto, trasfusione, anafilassi, allergia,

ipersensibilità di tipo I, congiuntivite allergica, rinite allergica e dermatite atopica; e in cui la malattia infiammatoria è scelta tra asma, appendicite, blefarite, bronchiolite, bronchite, borsite, cervicite, colangite, colecistite, colite, congiuntivite, cistite, dacrioadenite, dermatite, orticaria, dermatomiosite, encefalite, endocardite, endometrite, enterite, enterocolite, epicondilite, epididimite, fascite, fibrosite, gastrite, gastroenterite, epatite, idrosadenite suppurativa, laringite, mastite, meningite, mielite, miocardite, miosite, nefrite, ooforite, orchite, osteite, otite, pancreatite, parotite, pericardite, peritonite, faringite, pleurite, flebite, infiammazione polmonare, polmonite, proctite, prostatite, pielonefrite, rinite, salpingite, sinusite, stomatite, sinovite, tendinite, tonsillite, uveite, vaginite, vasculite, e vulvite.

**8.** Composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso nel trattamento di una malattia secondo la rivendicazione 7, in cui la malattia è scelta tra artrite reumatoide, artrite psoriasica, lupus, lupus eritematoso sistemico, uveite, orticaria, dermatite atopica, vasculite inclusa granulomatosi di Wegener, sindrome di Sjogren, spondilite anchilosante, e asma.

**9.** Composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso secondo la rivendicazione 6, in cui la malattia è cancro scelto tra linfoma diffuso a grandi cellule B, linfoma follicolare, linfoma linfocitico cronico, leucemia linfatica cronica, leucemia linfoblastica acuta a cellule B (B-ALL), leucemia prolinfocitica a cellule B, piccolo linfoma linfocitico

(SLL), mieloma multiplo, linfoma a cellule B non Hodgkin, linfoma linfoplasmocitico/macroglobulinemia di Waldenstrom, linfoma splenico della zona marginale, mieloma delle plasmacellule, plasmocitoma, linfoma a cellule B della zona marginale extranodale, linfoma a cellule B della zona marginale nodale, linfoma mantellare, linfoma a grandi cellule B mediastinico (timico), linfoma a grandi cellule B intravascolare, linfoma primitivo effusivo, leucemia/linfoma di Burkitt, e granulomatosi linfomatoide.

**10.** Composto e/o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'uso di una qualsiasi delle rivendicazioni da 6 a 9 in cui il composto e/o sale farmaceuticamente accettabile è somministrato in combinazione con uno o più agenti anti-cancro o antinfiammatori.

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.