

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2908823 DAL TITOLO:

“Procedimenti per trattare il cancro”

DEPOSITATA IL:

\*\*\* \*\*

### DESCRIZIONE

#### CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione è relativa in generale al campo del trattamento del cancro, e in particolare, il trattamento del cancro associato al complesso SWI/SNF (cioè, il cancro mediato da SWI/SNF). Più in particolare, la presente invenzione fornisce procedimenti e composizioni che trattano, alleviano, prevengono, diminuiscono o altrimenti migliorano i sintomi del cancro associato al complesso SWI/SNF.

#### CONTESTO DELL'INVENZIONE

Gli enzimi modificanti la cromatina associati a patologia (EZH2) giocano un ruolo in patologie come disturbi proliferativi, disturbi metabolici, e disturbi del sangue. Pertanto, c'è la necessità di sviluppare piccole molecole in grado di modulare l'attività di EZH2.

#### SOMMARIO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce un inibitore di EZH2 per l'uso nel trattamento del sarcoma epitelioide come rivendicato nelle rivendicazioni. Per esempio, il cancro associato a SWI/SNF è caratterizzato dalla ridotta espressione e/o dalla perdita di funzione del complesso SWI/SNF o di uno o più componenti del complesso SWI/SNF.

Per esempio, l'uno o più componenti sono scelti dal gruppo che consiste di SNF5, ATRX, e ARID1A.

Per esempio, la perdita di funzione è causata da una mutazione di perdita di funzione risultante da una mutazione puntiforme, una delezione, e/o un'inserzione.

Per esempio, il soggetto ha una delezione di SNF5.

E' qui descritto un soggetto che ha una mutazione di ATRX scelta dal gruppo che consiste di una sostituzione di asparagina (N) per il residuo di tipo selvatico lisina (K) nella posizione amminoacidica 688 di SEQ ID NO:5 (K688N), e una sostituzione di isoleucina (I) per il residuo di tipo selvatico metionina (M) nella posizione amminoacidica 366 di SEQ ID NO:5 (M366I).

E' qui descritto un soggetto che ha una mutazione di ARID1A scelta dal gruppo che consiste di una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico cisteina (C) nella posizione amminoacidica 884 di SEQ ID NO: 11 (C884\*), una sostituzione di lisina (K) per il residuo di tipo selvatico acido glutammico (E) nella posizione amminoacidica 966 (E966K), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutamina

Marco Giovanni Mari  
USBM - CP1-090

(Q) nella posizione amminoacidica 1411 di SEQ ID NO: 11 (Q1411\*), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico fenilalanina (F) nella posizione amminoacidica 1720 di SEQ ID NO: 11 (F1720fs), una mutazione per spostamento della griglia dopo il residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 1847 di SEQ ID NO: 11 (G1847fs), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico cisteina (C) nella posizione amminoacidica 1874 di SEQ ID NO: 11 (C1874fs), una sostituzione di acido glutammico (E) per il residuo di tipo selvatico acido aspartico (D) nella posizione amminoacidica 1957 (D1957E), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 1430 di SEQ ID NO: 11 (Q1430\*), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico arginina (R) nella posizione amminoacidica 1721 di SEQ ID NO: 11 (R1721fs), una sostituzione di acido glutammico (E) per il residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 1255 (G1255E), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 284 di SEQ ID NO: 11 (G284fs), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico arginina (R) nella posizione amminoacidica 1722 di SEQ ID NO: 11 (R1722\*), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico metionina (M) nella posizione amminoacidica 274 di SEQ ID NO: 11 (M274fs), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 1847 di SEQ ID NO: 11 (G1847fs), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico P nella posizione amminoacidica 559 di SEQ ID NO: 11 (P559fs), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico arginina (R) nella posizione amminoacidica 1276 di SEQ ID NO: 11 (R1276\*), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 2176 di SEQ ID NO: 11 (Q2176fs), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico istidina (H) nella posizione amminoacidica 203 di SEQ ID NO: 11 (H203fs), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico alanina (A) nella posizione amminoacidica 591 di SEQ ID NO: 11 (A591fs), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 1322 di SEQ ID NO: 11 (Q1322\*), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico serina (S) nella posizione amminoacidica 2264 di SEQ ID NO: 11 (S2264\*), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 586 di SEQ ID NO: 11 (Q586\*), una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 548 di SEQ ID NO: 11 (Q548fs), and una mutazione per spostamento della griglia nel residuo di tipo selvatico asparagina (N) nella posizione amminoacidica 756 di SEQ ID NO: 11 (N756fs).

E' qui descritto un procedimento per trattare o alleviare un sintomo di un cancro associato a SWI/SNF in un soggetto che ne necessita (a) determinando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare e geni soppressori tumorali in un campione ottenuto dal soggetto; (b) scegliendo il soggetto avente un livello diminuito di

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

espressione di almeno un gene nel passaggio a; e (c) somministrando al soggetto scelto nel soggetto b una quantità efficace di un inibitore di EZH2, in tal modo trattando o alleviando un sintomo del cancro nel soggetto.

E' qui descritto un procedimento per trattare o alleviare un sintomo di un cancro associato a SWI/SNF in un soggetto che ne necessita (a) determinando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste geni della via del riccio, geni della via myc e geni della istone metiltransferasi in un campione ottenuto dal soggetto; (b) scegliendo il soggetto avente un livello diminuito di espressione di almeno un gene nel passaggio a; e (c) somministrando al soggetto scelto nel soggetto b una quantità efficace di un inibitore di EZH2, in tal modo trattando o alleviando un sintomo del cancro nel soggetto.

Per esempio, il gene della differenziazione neuronale è CD133, DOCK4, o PTPRK.

Per esempio, il gene dell'inibizione del ciclo cellulare è CKDN1A o CDKN2A.

Per esempio, il gene soppressore tumorale è BIN1.

Per esempio, il gene della via del riccio è GLI1 o PTCH1.

Per esempio, il gene della via myc è MYC.

Per esempio, il gene della istone metiltransferasi è EZH2.

E' qui descritto un procedimento per indurre la differenziazione neuronale, l'inibizione del ciclo cellulare o la soppressione tumorale mettendo in contatto una cellula con un inibitore di EZH2. L'inibitore di EZH2 può essere in una quantità sufficiente ad aumentare l'espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di CD133, DOCK4, PTPRK, CKDN1A, CDKN2A e BIN1.

E' qui descritto un procedimento per inibire la segnalazione riccio mettendo in contatto una cellula con un inibitore di EZH2. L'inibitore di EZH2 può essere in una quantità sufficiente a ridurre l'espressione di GLI1 e/o PTCH1.

E' qui descritto un procedimento per indurre l'espressione genica mettendo in contatto una cellula con un inibitore di EZH2. L'inibitore di EZH2 può essere in una quantità sufficiente per indurre la differenziazione neuronale, l'inibizione del ciclo cellulare e/o la soppressione tumorale. Per esempio, il gene può essere CD133, DOCK4, PTPRK, CKDN1A, CDKN2A o BIN1.

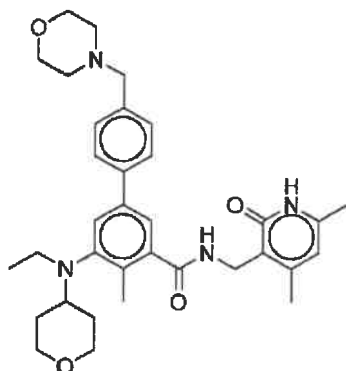
E' qui descritto un procedimento per inibire l'espressione genica mettendo in contatto una cellula con un inibitore di EZH2. L'inibitore di EZH2 è in una quantità sufficiente a inibire la segnalazione riccio. Per esempio, il gene può essere GLI1 o PTCH1.

Per esempio, la cellula può avere una perdita di funzione di SNF5, ARID1A, ATRX, e/o di un componente del complesso SWI/SNF.

Per esempio, la perdita di funzione è causata da una delezione di SNF5.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI 090

L'inibitore di EZH2 è il Composto A avente la seguente formula:



(A),  
suoi stereoisomeri, o suoi sali o solvati farmaceuticamente accettabili.

Se non altrimenti definito, tutti i termini tecnici e scientifici usati qui hanno il medesimo significato come comunemente compreso da una persona di normale abilità nella tecnica a cui appartiene questa invenzione. Nella descrizione dettagliata, le forme singolari includono anche il plurale a meno che il contesto indichi chiaramente altrimenti. Sebbene materiali e metodi simili o equivalenti a quelli descritti qui possano essere usati nella pratica di o per testare la presente invenzione, i materiali e i metodi opportuni sono descritti sotto.

I riferimenti citati qui non sono ammessi come tecnica precedente all'invenzione rivendicata. In caso di conflitto, controllerà la presente descrizione dettagliata, definizioni incluse. In aggiunta, i materiali, metodi ed esempi sono solo illustrativi e non si intende che siano limitanti.

Altri tratti distintivi e vantaggi dell'invenzione saranno evidenti dalla seguente descrizione dettagliata e dalle rivendicazioni.

#### BREVE DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Le Figure 1A e 1B sono una serie di analisi Western blot di linee cellulari con SNF5 di tipo selvatico (RD e SJCRH30) e mutante.

Le Figure 2A-2E sono una serie di grafici che stabiliscono che le linee cellulari SNF5 mutanti A204 (C), G401 (D) e G402 (E) rispondono selettivamente al composto EZH2 (Composto E) in confronto alle linee cellulari di tipo selvatico RD (A) e SJCRH30 (B).

Le Figure 3A-3D sono una serie di grafici a barre che mostrano che la linea cellulare SNF G401 mutante risponde al Composto E dopo 7 giorni in agar morbido in confronto alle cellule RD di tipo selvatico. A mostra la linea cellulare RD (5,000 cellule/pozzetto). B mostra cellule G401 (5,000 cellule/pozzetto). C mostra cellule G401 in crescita 2D. D mostra cellule G401 (10,000 cellule/pozzetto).

Le Figure 4A-4D sono Quattro grafici che mostrano che la linea cellulare SNF5 G401 mutante è sensibile al Composto A in vitro. La linea cellulare di tipo selvatico SJCRH30 (A) e RD (C) e la linea cellulare SNF5 mutante G401 (B) e A204 (D) sono state pretrattate per 7 giorni con le concentrazioni indicate di Composto A e ri-piastrate il giorno 0. La vitalità cellulare è stata determinata mediante il saggio per la vitalità

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPI-090

cellulare CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability.

Le Figure 5A-5D sono una serie di grafici che mostrano regressioni durevoli in xenotrapianti G401 (modello di tumore rabdoide maligno) con trattamento con il Composto A. (A) Regressioni del tumore indotte dal Composto A alle dosi indicate. (B) Regressioni del tumore indotte dalla somministrazione due volte al giorno di Composto A alle dosi indicate. I dati rappresentano i valori medi  $\pm$  SEM (n=8). La somministrazione del Composto è stata fermata il giorno 28. (C) Inibizione del bersaglio EZH2 in tessuto tumorale da xenotrapianto G401 raccolto da una coorte parallela di topi il giorno 21. Ogni punto mostra il rapporto di H3K27Me3 su H3 totale. Le linee orizzontali rappresentano i valori medi del gruppo. BLLQ = al di sotto del limite inferiore di quantificazione. (D, E) Colorazione immunohistochemica della metilazione di istoni tumorali di campioni di tumore da topi trattati con veicolo (D) e con il Composto A (E) (a 125 mg/kg).

La Figura 6 è un grafico che mostra le posizioni delle mutazioni di ATRX identificate in linee cellulari SCLC.

La Figura 7A è un grafico che mostra che le cellule del cancro alla prostata LNCAP mostrano un'inibizione della crescita cellulare dose-dipendente con il trattamento con il Composto E *in vitro*.

La Figura 7B è un grafico che mostra il valore di IC<sub>50</sub> del Composto E il giorno 11 e il giorno 14 per cellule WSU-DLCL2 e LNCAP.

Le Figure 8A-8C sono tre grafici che stabiliscono che le linee SCLC ATRX mutanti NCI-H446 (A), SW1271 (B) e NCI-H841 (C) rispondono al Composto E.

Le Figure 9A-9C sono tre immagini al microscopio che mostrano che la linea SCLC NCI-H841 cambia morfologia dopo il trattamento con il veicolo (A) o il Composto E a una concentrazione di 4.1E-02  $\mu$ M (B) o 3.3  $\mu$ M (C).

Le Figure 10A-10C sono una serie di grafici che mostrano gli effetti del Composto A sulla metilazione degli istoni globale cellulare e sulla vitalità cellulare (A) Struttura chimica del Composto A, (B) Inibizione concentrazione-dipendente dei livelli di H3K27Me3 cellulare in cellule G401 e RD. (C) Inibizione selettiva della proliferazione di cellule G401 con *SMARCB1* cancellato mediante il Composto A *in vitro* (misurato dal contenuto di ATP). Le cellule G401 (panelli a e b) e RD (panelli c e d) sono state ri-piastrate alle densità di semina originali il giorno 7. Ogni punto rappresenta la media per ogni concentrazione (n=3).

Le Figure 11A e 11B sono una serie di grafici che mostrano studi del meccanismo biochimico di azione. Il valore di IC<sub>50</sub> del Composto A aumenta al crescere della concentrazione di SAM (A) ed è influenzato in maniera minima dalla concentrazione crescente di oligonucleosomi (B), indicando un meccanismo di azione SAM-competitivo e nucleosoma-non competitivo.

Le Figure 12A e 12B sono una serie di pannelli che dimostrano la verifica dell'espressione di SMARCB 1 e EZH2 in linee cellulari e la

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPI-090

specificità del Composto A per l'inibizione della metilazione degli istoni cellulare. (A) I lisati cellulari sono stati analizzati mediante immunoblot con anticorpi specifici per SMARCB 1, EZH2 e Actina (controllo di carico). (B) Inibizione selettiva della metilazione di H3K27 cellulare in cellule G401 e RD. Le cellule sono state incubate con il Composto A per 4 giorni, e gli istoni estratti con acido sono stati analizzati mediante immunoblot.

Le Figure 13A e 13B sono una serie di grafici a barre che dimostrano che il Composto A induce l'arresto in G<sub>1</sub> e l'apoptosi in cellule MRT con *SMARCB1* cancellato. Analisi del ciclo cellulare (mediante citometria a flusso) e determinazione dell'apoptosi (mediante saggio TUNEL) in cellule RD (pannello A) o G401 (pannello B) durante incubazione con o veicolo o 1  $\mu$ M Composto A per fino a 14 giorni. L'arresto in G<sub>1</sub> è stato osservato il giorno 7 e l'apoptosi è stata indotta il giorno 11. I dati sono rappresentati come valori medi  $\pm$  SEM (n=2). I valori di controllo con DMSO mostrati sono la media  $\pm$  SEM da ciascun punto temporale. Le cellule sono state divise e ri-piastrate i giorni 4, 7 e 11 alla densità di semina originale.

Le Figure 14A-14B sono una serie di grafici che mostrano che il Composto A induce cambiamenti nell'espressione di geni regolati da SMARCB 1 e nella morfologia cellulare. (A) Espressione basale di geni regolati da SMARCB 1 in cellule G401 con *SMARCB1* cancellato, rispetto a cellule di controllo RD (misurato mediante qPCR, n=2). (B) Cellule G401 e RD sono state incubate con o DMSO o 1  $\mu$ M Composto A per 2, 4 e 7 giorni. L'espressione genica è stata determinata mediante qPCR (n=2) ed è espresso rispetto al controllo con DMSO di ogni punto temporale. I pannelli a-j corrispondono ai geni GLI1, PTCh1, DOCK4, CD133, PTPRK, BIN1, CDKN1A, CDKN2A, EZH2, e MYC, rispettivamente. (C) Cellule G402 sono state incubate con o DMSO (pannello di sinistra) o 1  $\mu$ M Composto A (pannello di destra) per 14 giorni. Le cellule sono state divise e ri-piastrate alla densità di semina originale il giorno 7.

Le Figure 15A-15D sono serie di grafici che dimostrano i pesi corporei, le regressioni tumorali e i livelli plasmatici in topi che portano xenotrapianti di G401 trattati con il Composto A. (A) I pesi corporei sono determinati due volte alla settimana per animali trattati con il Composto A un programma BID per 20 giorni. I dati sono presentati come valori medi  $\pm$  SEM (n=16 fino al giorno 21, n=8 dal giorno 22 a 60). (B) Regressioni tumorali indotte dalla somministrazione due volte al giorno (BID) del Composto A per 21 giorni alle dosi indicate (valori medi  $\pm$  SEM, n=16). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, misure ripetute ANOVA, post test di Dunnett vs. veicolo. (C) Pesi dei tumori di 8 topi sottoposti a eutanasia il giorno 21. \*\*\*\* p < 0.0001, test esatto di Fisher. (D) Il plasma è stato raccolto 5 minuti prima e 3 ore dopo il dosaggio del Composto A il giorno 21, e i livelli del composto sono stati misurati mediante LC-MS/MS. Gli animali sono stati sottoposti a eutanasia, e i tumori sono stati raccolti 3 ore dopo il dosaggio il giorno 21. Omogenati dei tumori sono stati generati e sottoposti ad analisi LC-MS/MS per determinare le concentrazioni del Composto A. Da notare che non è stato possibile determinare i livelli tumorali del composto da tutti gli animali soprattutto nei gruppi di dosaggio

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPI-090

più alto poiché gli xenotrapianti erano troppo piccoli il giorno 21. I punti rappresentano i valori per gli animali individuali; le linee orizzontali rappresentano i valori medi per gruppo.

Le Figure 16A-16C sono una serie di grafici che mostrano che il Composto A eradica gli xenotrapianti MRT con *SMARCB1* cancellato in topi SCID. (A) Regressioni tumorali indotte dalla somministrazione due volte al giorno (BID) di Composto A per 28 giorni alle dosi indicate. La somministrazione del Composto è stata fermata il giorno 28 e ai tumori è stato permesso di ri-crescere finché hanno raggiunto i 2000 mm<sup>3</sup> (dati mostrati come valori medi  $\pm$  SEM, n=8). (B) Inibizione del bersaglio di EZH2 in tessuto tumorale di xenotrapianto di G401 raccolto da topi sottoposti a eutanasia il giorno 21. Ogni punto mostra il rapporto di H3K27Me3 su H3 totale, misurato mediante ELISA. Le linee orizzontali rappresentano i valori medi per gruppo; i simboli grigi sono i valori al di fuori della curva standard ELISA. (C) Cambiamento nell'espressione genica in tessuto tumorale di xenotrapianto di G401 raccolto da topi trattati con il Composto A per 21 giorni. I pannelli a-d corrispondono ai geni CD133, PTPRK, DOCK4, e GLI1, rispettivamente. I dati sono presentati come cambio in volte in confronto al veicolo  $\pm$  SEM (n=6, n=4 per 500 mg/kg gruppo). \* p < 0.05, \*\* p < 0.01, \*\*\*\* p < 0.0001, vs. veicolo, test esatto di Fisher.

#### DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si basa in parte sulla scoperta che gli inibitori di EZH2 possono trattare efficacemente i cancri associate a SWI/SNF che sono caratterizzati dalle espressioni alterate e/o dalla Perdita di funzione di certi biomarcatori o geni. Specificamente, i tumori o le cellule tumorali che hanno espressioni alterate e/o perdita di funzione di biomarcatori o geni selezionati sono sensibili agli inibitori di EZH2 della presente invenzione. Di conseguenza, la presente invenzione fornisce un inibitore di EZH2 per l'uso nel trattamento del sarcoma epitelioide come definito nelle rivendicazioni. Sono qui descritti procedimenti per trattare o alleviare un sintomo di cancri in un soggetto somministrando una quantità terapeutamente efficace di un inibitore di EZH2 al soggetto, in particolare per trattare cancri associati all'espressione alterata e/o alla perdita di funzione di certi biomarcatori o geni. Per esempio, il biomarcatore è un componente del complesso SWI/SNF. Per esempio, il gene è scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare, geni soppressori tumorali, geni della via del riccio, geni della via myc e geni della istone metiltransferasi.

Il complesso SWI/SNF nell'essere umano include almeno subunità del core evolutivamente conservate e subunità varianti. Le subunità del core evolutivamente conservate includono SNF5 (chiamato anche SMARCB1, INI1 o BAF47), SMARCA4 (noto anche come gene 1 relativo a BRM/SWI2, BRG1), BAF155, e BAF170. Le subunità varianti includono BAF53 (A o B), BAF60 (A, B o C), BAF 57, BAF45 (A, B, C, o D). Altre subunità includono ARID1A (anche noto come SMARCF1), ARID1B, SMARCA2 (anche noto come omologo brama, BRM), ATRX,

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPL 090

BAF200, BAF180 (anche noto come PBRM1), e contenente bromodominio 7 (BRD7). L' almeno un componente del complesso SWI/SNF può essere qualsiasi componente del complesso, per esempio, il componente/subunità descritto qui o noto nella tecnica.

In qualsiasi dei procedimenti presentati qui, il gene della differenziazione neuronale può essere, ma non è limitato a, CD133 (anche chiamato PROM1), DOCK4, PTPRK, PROM2, LHX1, LHX6, LHX9, PAX6, PAX7, VEFGA, FZD3B, FYN, HIF1A, HTRA2, EVX1, CCDC64, o GFAP.

In qualsiasi dei procedimenti presentati qui, il gene dell' inibizione del ciclo cellulare può essere, ma non è limitato a, CKDN1A, CDKN2A, MEN1, CHEK1, IRF6, ALOX15B, CYP27B1, DBC1, NME6, GMNN, HEXIM1, LATS1, MYC, HRAS, TGFB1, IFNG, WNT1, TP53, THBS1, INHBA, IL8, IRF1, TPR, BMP2, BMP4, ETS1, HPGD, BMP7, GATA3, NR2F2, APC, PTPN3, CALR, IL12A, IL12B, PML, CDKN2B, CDKN2C, CDKN1B, SOX2, TAF6, DNA2, PLK1, TERF1, GAS1, CDKN2D, MLF1, PTEN, TGFB2, SMAD3, FOXO4, CDK6, TFAP4, MAP2K1, NOTCH2, FOXC1, DLG1, MAD2L1, ATM, NAE1, DGKZ, FHL1, SCRIB, BTG3, PTPRK, RPS6KA2, STK11, CDKN3, TBG1, CDC73, THAP5, CRLF3, DCUN1D3, MYOCD, PAF1, LILRB1, UHMK1, PNPT1, USP47, HEXIM2, CDK5RAP1, NKX3-1, TIPIN, PCBP4, USP44, RBM38, CDT1, RGCC, RNF167, CLSPN, CHMP1A, WDR6, TCF7L2, LATS2, RASSF1, MLTK, MAD2L2, FBXO5, ING4, o TRIM35.

In qualsiasi dei procedimenti presentati qui, il gene soppressore tumorale può essere, ma non è limitato a, BIN1. Come usato qui, il termine "gene soppressore tumorale" ha il suo significato comunemente inteso nella tecnica, cioè, un gene la cui espressione e la cui normale funzione agiscono per sopprimere il fenotipo neoplastico o per indurre apoptosi, o per entrambi. In alcune forme di attuazione, i geni soppressori tumorali includono i geni dell' inibizione del ciclo cellulare. Categorie esemplari di soppressori tumorali basate sulla loro funzione includono, ma non sono limitate a:

(1) geni che inibiscono i cicli cellulari;

(2) geni che stanno accoppiando il ciclo cellulare al danno al DNA. Quando c'è DNA danneggiato nella cellula, la cellula non dovrebbe dividersi. Se il danno può essere riparato, il ciclo cellulare può continuare. Se il danno non può essere riparato, la cellula dovrebbe iniziare l' apoptosi (morte cellulare programmata);

(3) geni che prevencono la dispersione delle cellule tumorali, bloccano la perdita dell' inibizione da contatto, e inibiscono la metastasi. Questi geni e le loro proteine codificate sono anche noti come soppressori di metastasi;

e

(4) proteine per la riparazione del DNA. Mutazioni in questi geni aumentano il rischio di cancro.

In qualsiasi dei procedimenti presentati qui, il gene della via di segnalazione di riccio può essere, ma non è limitato a, GLI1, PTCH1, SUFU, KIF7, GLI2, BMP4, MAP3K10, SHH, TCTN3, DYRK2, PTCHD1, o SMO.

In qualsiasi dei procedimenti presentati qui, il gene della via myc può essere, ma non è limitato a, MYC NMI, NFYC, NFYB, Ciclina T1, RuvB-simile 1, GTF2I, BRCA1, proteina 1 inducente metastasi e invasione di linfomi a cellule T, ACTL6A, PCAF, MYCBP2, MAPK8, Bcl-2, Omologo della proteina di inizio della trascrizione SPT3, SAP130, DNMT3A, madri contro l'omologo decapentaplegico 3, MAX, madri contro l'omologo decapentaplegico 2, MYCBP, HTATIP, ZBTB17, Proteina associata ai domini di trasformazione/trascrizione, TADA2L, PFDN5, MAPK1, TFAP2A, P73, TAF9, YY1, SMARCB1, SMARCA4, MLH1, EP400 o let-7.

In qualsiasi dei procedimenti presentati qui, il gene della istone metiltransferasi può essere, ma non è limitato a, EZH2.

I composti descritti qui inibiscono l'attività della istone metiltransferasi di EZH2 o di un suo mutante e, di conseguenza, i composti descritti qui sono i candidati per trattare o prevenire certe condizioni e patologie. Sono qui descritti procedimenti per trattare, prevenire o alleviare un sintomo di cancro o una condizione pre-cancerosa. Il procedimento include somministrare a un soggetto che ne necessita, una quantità terapeuticamente efficace di un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, solvato, o stereoisomero farmaceuticamente accettabile. Cancri esemplari che possono essere trattati includono il sarcoma epitelioide. Alternativamente, i cancri da trattare mediante i composti sono cancri non NHL.

E' qui descritto l'uso di un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo o solvato farmaceuticamente accettabile nel trattamento di cancro o pre-cancro, o, per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento di tale cancro o pre-cancro. Cancri esemplari che possono essere trattati includono il sarcoma epitelioide.

I composti descritti qui possono essere usati per modulare la metilazione di proteine (per es., di istone), per es., per modulare l'attività degli enzimi istone metiltransferasi o istone demetilasi. I composti descritti qui possono essere usati *in vivo* o *in vitro* per modulare la metilazione di proteine. Sulla base della sorprendente scoperta che la regolazione della metilazione mediante EZH2 implica la formazione di tumori, in particolare tumori che portano l'espressione alterata e/o la perdita di funzione de biomarcatori/geni selezionati, i composti descritti qui sono candidati adatti per trattare queste patologie, cioè, per diminuire la metilazione o ripristinare la metilazione all'incirca al suo livello in cellule normali della controparte.

I composti descritti qui possono inibire selettivamente la proliferazione del tumore o delle cellule tumorali associati al complesso SWI/SNF (come mostrato nelle Figure 1-9). Di conseguenza, sono qui descritti procedimenti per trattare, prevenire o alleviare un sintomo del cancro associato al complesso SWI/SNF o di una condizione pre-cancerosa mediante un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo o solvato

Marco Giovanni Mari  
USBM CPI-090

farmaceuticamente accettabile. E' qui descritto l'uso di un composto descritto qui, o di un suo sale, polimorfo o solvato farmaceuticamente accettabile nel trattamento del cancro associato al complesso SWI/SNF o per la preparazione di un medicamento utile per il trattamento di tale cancro.

Sono qui descritti procedimenti per determinare la responsività di un soggetto avente un cancro a un inibitore di EZH2. Il procedimento include i passaggi di ottenere un campione (un campione di acido nucleico o un campione di proteina) dal soggetto e rivelare l'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF, rivelare l'espressione e/o la funzione di questo componente, e la presenza di tale espressione ridotta, aploinsufficienza, e/o perdita di funzione indica che il soggetto è responsivo all'inibitore di EZH2. Il termine "campione" significa qualsiasi campione biologico derivato dal soggetto, include ma non è limitato a, cellule, campioni di tessuti, liquidi corporei (inclusi, ma non limitato a, muco, sangue, plasma, siero, urina, saliva e sperma), cellule tumorali, e tessuti tumorali. I campioni possono essere forniti dal soggetto sotto trattamento o esame. Alternativamente i campioni possono essere ottenuti dal medico secondo la pratica di routine nella tecnica.

Sono qui descritti procedimenti per determinare la predisposizione di un soggetto a un cancro o a una condizione pre-cancerosa ottenendo un campione dal soggetto e rivelando l'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF, e la presenza di tale espressione ridotta, aploinsufficienza, e/o perdita di funzione indica che il soggetto è predisposto a (cioè, ha un più alto rischio di) sviluppare il cancro o la condizione pre-cancerosa in confronto a un soggetto senza tale perdita di funzione dell'almeno un componente del complesso SWI/SNF.

Il termine "predisposto" come usato qui in relazione a cancro o a una condizione pre-cancerosa è inteso che significhi l'aumentata probabilità (per es., almeno 1%, 5%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%, 150%, 200%, o più di aumento di probabilità) che un soggetto con l'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF, soffrirà di cancro o di una condizione pre-cancerosa, in confronto alla probabilità che un altro soggetto non avente l'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF, soffra di cancro o di una condizione pre-cancerosa, in circostanze dove altri fattori di rischio (per es., chimico/ambientale, alimentare, e passato di fumatore, ecc.) per il cancro o una condizione pre-cancerosa tra i soggetti siano le medesime.

"Rischio" nel contesto della presente descrizione illustrativa, è relativo alla probabilità che un evento si verifichi in un periodo di tempo specifico e può significare un rischio "assoluto" o un rischio "relativo" per un soggetto. Il rischio assoluto può essere misurato con

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

riferimento o all'effettiva osservazione post-misurazione per la coorte di tempo rilevante, o ai valori indice sviluppati dalle coorti storiche statisticamente valide che sono state seguite per il periodo di tempo rilevante. Il rischio relativo si riferisce al rapporto dei rischi assoluti di un soggetto in confronto o ai rischi assoluti delle coorti a basso rischio o al rischio medio di una popolazione, che può variare di come sono accertati i fattori di rischio clinici. I rapporti di probabilità, la proporzione tra eventi positivi ed eventi negativi per un dato risultato di esame, sono anche comunemente usati (le probabilità sono secondo la formula  $p/(1-p)$  dove  $p$  è la probabilità dell'evento e  $(1-p)$  è la probabilità di nessun evento) per nessuna conversione.

Di conseguenza, sono qui descritti medicine, trattamenti e/o gestioni del cancro personalizzati per un soggetto mediante il vaglio genetico dell'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF nel soggetto. Per esempio, sono qui descritti procedimenti per trattare, prevenire o alleviare un sintomo di cancro o di una condizione pre-cancerosa determinando la responsività del soggetto a un inibitore di EZH2 e quando il soggetto è responsivo all'inibitore di EZH2, somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di EZH2, o un suo sale, solvato, o stereoisomero farmaceuticamente accettabile. La responsività è determinata ottenendo un campione dal soggetto e rivelando l'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF (come SNF5, ARID1A o ATRX), e la presenza di tale perdita di funzione indica che il soggetto è responsivo all'inibitore di EZH2.

In un altro esempio, sono qui descritti procedimenti di gestione del cancro in un soggetto determinando la predisposizione del soggetto a un cancro o a una condizione pre-cancerosa periodicamente. I procedimenti includono i passaggi di ottenere un campione dal soggetto e rivelare l'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF, e la presenza di tale ridotta espressione, aploinsufficienza e/o perdita di funzione indica che il soggetto è predisposto a sviluppare il cancro o la condizione pre-cancerosa in confronto a un soggetto senza tale espressione ridotta, aploinsufficienza, e/o perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF.

Per scopi illustrativi, i procedimenti di trattamento presentati qui includono i passaggi di (a) raccogliere un campione di acido nucleico o un campione di proteina da un campione biologico ottenuto da un soggetto, (b) misurare il livello di espressione o il livello di funzione di un componente del complesso SWI/SNF nel campione, (c) misurare il livello di espressione o il livello di funzione del componente del SWI/SNF in un campione di controllo; (d) confrontare il livello di espressione o il livello di funzione del componente misurato nel passaggio (b) nel campione testato al livello di espressione o al livello di funzione del componente misurato nel passaggio (c) nel campione di controllo (o un valore di riferimento); (e) identificare il soggetto come un candidato per il trattamento quando il livello di espressione o il livello di funzione del componente

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

misurato nel passaggio (b) è ridotto o perso (per es., aploinsufficienza o perdita di funzione) in confronto al livello di espressione o al livello di funzione del componente misurato nel passaggio (c); e (f) somministrare una quantità terapeuticamente efficace di un inibitore di EZH2 al soggetto identificato nel passaggio (e) o selezionare un regime di trattamento per il soggetto identificato nel passaggio (e). Il livello di espressione o il livello di funzione del componente nel campione in oggetto è ridotto, per esempio, del 10%, 25%, 50% o 1, 2, 5 o più volte in confronto al livello di espressione o al livello di funzione del componente nel campione di controllo. Qualsiasi procedimento opportuno noto nella tecnica può essere utilizzato per misurare il livello di espressione o il livello di funzione del componente del complesso SWI/SNF. In alcune forme di attuazione, il componente è SNF5, ARID1A o ATRX.

Per esempio, il soggetto identificato può essere trattato con lo standard del trattamento di cura come descritto nelle più attuali linee guida del National Comprehensive Cancer Network (NCCN).

Per esempio, un campione di controllo è ottenuto da un soggetto normale, sano. Alternativamente, un campione di controllo è ottenuto da un soggetto che non sta soffrendo per, non è stato diagnosticato con, o non è a rischio di sviluppare un cancro associato al complesso SWI/SNF.

E' qui descritto un procedimento per trattare o alleviare un sintomo di cancro in un soggetto determinando la responsività del soggetto a un inibitore di EZH2 e somministrando al soggetto una quantità terapeuticamente efficace dell'inibitore di EZH2 se il soggetto è responsivo all'inibitore di EZH2 e il soggetto ha un cancro scelto dal gruppo che consiste di cancro al cervello e al SNC, cancro al rene, cancro ovarico, cancro pancreatico, leucemia, linfoma, mieloma, e/o sarcoma. Tale responsività è determinata ottenendo un campione dal soggetto e rivelando l'espressione ridotta, l'aploinsufficienza, e/o la perdita di funzione di SNF5, ARID1A, e/o ATRX, e la presenza di espressione ridotta, aploinsufficienza, e/o perdita di funzione indica che il soggetto è responsivo all'inibitore di EZH2.

Senza essere legati da alcuna teoria, un composto descritto qui inibisce in maniera specifica la metilazione di H3K27 cellulare portando all'uccisione apoptotica selettiva di cellule MRT SMARCB1 mutanti. Per esempio, il trattamento *in vitro* di linee cellulari MRT con SMARCB1 cancellato con il Composto A ha indotto forti effetti anti-proliferativi con valori di IC<sub>50</sub> nel campo di variazione nM; mentre le linee cellulari di controllo (tipo selvatico) erano minimamente colpite (Figura 10C e tabella 6). Inoltre, il composto descritto qui induce i geni della differenziazione neuronale, dell'inibizione del ciclo cellulare e della soppressione tumorale mentre sopprime l'espressione dei geni della via del riccio, MYC ed EZH2. Per esempio, il trattamento con il Composto A di cellule G401 con SMARCB1 cancellato per fino a 7 giorni induceva fortemente l'espressione di CD133, DOCK4 e PTPRK e regolava in senso incrementante gli inibitori del ciclo cellulare CDKN1A e CDKN2A e il soppressore tumorale BIN1, tutti in una maniera dipendente dal tempo (Figura 14B). Simultaneamente, era ridotta l'espressione dei geni della via del riccio,

Marco Giovanni Mari  
USBM-CB1-000

*MYC* e *EZH2*. E' interessante notare che, le cellule G402 con *SMARCB1* cancellato esposte al Composto A per 14 giorni assumevano una morfologia neurone-simile (Figura 14C).

Di conseguenza sono qui descritti procedimenti per trattare o alleviare un sintomo di cancro in un soggetto che ne necessita (a) determinando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare e geni soppressori tumorali in un campione ottenuto dal soggetto; (b) selezionando un soggetto avente un livello di espressione diminuito di almeno un gene nel passaggio (a); e (c) somministrando al soggetto scelto nel passaggio (b) una quantità efficace di un composto descritto qui, pertanto trattando o alleviando un sintomo di cancro nel soggetto.

Sono qui descritti procedimenti per trattare o alleviare un sintomo di cancro in un soggetto che ne necessita (a) determinando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della via del riccio, geni della via *myc* e geni della istone metiltransferasi in un campione ottenuto dal soggetto; (b) selezionando un soggetto avente un livello di espressione aumentato di almeno un gene nel passaggio (a); e (c) somministrando al soggetto scelto nel passaggio (b) una quantità efficace di un composto descritto qui, pertanto trattando o alleviando un sintomo di cancro nel soggetto.

Sono qui forniti anche procedimenti per selezionare una terapia per il cancro per un soggetto che ne necessita (a) determinando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare e geni soppressori tumorali in un campione ottenuto dal soggetto, e (b) selezionando una terapia per il cancro quando il soggetto ha un livello di espressione diminuito di almeno un gene nel passaggio (a), dove la terapia per il cancro include la somministrazione di una quantità efficace di un composto descritto qui al soggetto.

Sono qui descritti procedimenti per selezionare una terapia per il cancro per un soggetto che ne necessita (a) determinando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della via del riccio, geni della via *myc* e geni della istone metiltransferasi in un campione ottenuto dal soggetto, e (b) selezionando una terapia per il cancro quando il soggetto ha un livello di espressione aumentato di almeno un gene nel passaggio (a), dove la terapia per il cancro include la somministrazione di una quantità efficace di un composto descritto qui al soggetto.

In esempi puramente illustrativi, i procedimenti presentati qui possono includere i passaggi di (a) raccogliere un campione di acido nucleico o un campione di proteina da un campione biologico ottenuto da un soggetto, (b) misurare il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare, e geni soppressori tumorali nel campione, (c) misurare il livello di espressione del(i) medesimo(i) gene(i) in un campione di controllo; (d) confrontare il livello di espressione del

Marco Giovanni Mari  
USBM / CPI-090

gene misurato nel passaggio (b) nel campione testato al livello di espressione del gene misurato nel passaggio (c) nel campione di controllo (o a un valore di riferimento); (e) identificare il soggetto come un candidato per il trattamento quando il livello di espressione del componente misurato nel passaggio (b) è ridotto in confronto al livello di espressione del gene misurato nel passaggio (c); e (f) somministrare una quantità terapeuticamente efficace di un inibitore di EZH2 al soggetto identificato nel passaggio (e) o selezionare un regime di trattamento per il soggetto identificato nel passaggio (e). Il livello di espressione del gene nel soggetto testato è ridotto, per esempio, del 10%, 25%, 50% o 1, 2, 5 o più volte in confronto al livello di espressione del gene nel campione di controllo.

In esempi puramente illustrativi, i procedimenti presentati qui possono includere i passaggi di (a) raccogliere un campione di acido nucleico o un campione di proteina da un campione biologico ottenuto da un soggetto, (b) misurare il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della via del riccio, geni della via myc e geni della istone metiltransferasi nel campione, (c) misurare il livello di espressione del(i) medesimo(i) gene(i) in un campione di controllo; (d) confrontare il livello di espressione del gene misurato nel passaggio (b) nel campione testato al livello di espressione del gene misurato nel passaggio (c) nel campione di controllo (o a un valore di riferimento); (e) identificare il soggetto come un candidato per il trattamento quando il livello di espressione del componente misurato nel passaggio (b) è aumentato in confronto al livello di espressione del gene misurato nel passaggio (c); e (f) somministrare una quantità terapeuticamente efficace di un inibitore di EZH2 al soggetto identificato nel passaggio (e) o selezionare un regime di trattamento per il soggetto identificato nel passaggio (e). Il livello di espressione del gene nel soggetto testato è aumentato, per esempio, del 10%, 25%, 50% o 1, 2, 5 o più volte in confronto al livello di espressione del gene nel campione di controllo.

Il termine "livello di espressione" si riferisce al livello di proteina, RNA, o mRNA di un particolare gene di interesse. Qualsiasi procedimento noto nella tecnica può essere utilizzato per determinare il livello di espressione di un particolare gene di interesse. Gli esempi includono, ma non sono limitati a, trascrizione inversa e saggi di amplificazione (come PCR, RT-PCR di ligazione o RT-PCR quantitativa), saggi di ibridazione, Northern blot, dot blot, ibridazione *in situ*, elettroforesi su gel, elettroforesi capillare, cromatografia su colonna, Western blot, immunoistochimica, immunocolorazione, o spettrometria di massa. I saggi possono essere eseguiti direttamente sui campioni biologici o su proteine/acidi nucleici isolati dai campioni. E' pratica di routine nella tecnica pertinente effettuare questi saggi. Per esempio, il passaggio di misurazione in qualsiasi procedimento descritto qui include mettere in contatto il campione di acido nucleico dal campione biologico ottenuto dal soggetto con uno o più inneschi che si ibridano in maniera specifica al gene di interesse presentato qui. Alternativamente, il passaggio di misurazione di qualsiasi procedimento descritto qui include mettere in contatto il campione di proteina dal campione biologico ottenuto dal soggetto

Marco Giovanni Mari  
USBM CPI-090

con uno o più anticorpi che si legano al biomarcatore di interesse presentato qui.

Un livello di espressione diminuito di un particolare gene significa una diminuzione nel suo livello di espressione di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500%, o più in confronto a un valore di riferimento o al livello di espressione di questo gene misurato in un campione differente (o precedente) ottenuto dal medesimo soggetto.

Un livello di espressione aumentato di un particolare gene significa un aumento nel suo livello di espressione di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500%, o più in confronto a un valore di riferimento o al livello di espressione di questo gene misurato in un campione differente (o precedente) ottenuto dal medesimo soggetto.

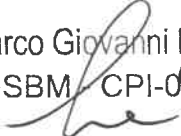
Un "livello/valore di riferimento o di base" come usato qui può essere usato in maniera interscambiabile e si intende che sia relativo a un numero o a un valore derivato da studi di popolazione, includendo senza limitazione, i soggetti aventi campo di variazione dell'età simile, stato patologico (per es., stadio), soggetti nel medesimo o simile gruppo etnico, o relativo al campione di partenza di un soggetto che si sta sottoponendo a trattamento per il cancro. Tali valori di riferimento possono essere derivati da analisi statistiche e/o da dati di predizione del rischio di popolazioni ottenuti da algoritmi matematici e indici calcolati del cancro. Gli indici di riferimento possono anche essere costruiti e usati usando algoritmi e altri procedimenti di classificazione statistica e strutturale.

Descritto qui, il valore di riferimento o di base può essere il livello di espressione di un particolare gene di interesse in un campione di controllo derivato da uno o più soggetti sani o da soggetti che non sono stati diagnosticati con alcun cancro.

Descritto qui, il valore di riferimento o di base può essere il livello di espressione di un particolare gene di interesse in un campione ottenuto dal medesimo soggetto prima di qualsiasi trattamento per il cancro. Descritto qui, il valore di riferimento o di base può essere il livello di espressione di un particolare gene di interesse in un campione ottenuto dal medesimo soggetto durante un trattamento per il cancro. Alternativamente, il valore di riferimento o di base è una precedente misurazione del livello di espressione di un particolare gene di interesse in un campione precedentemente ottenuto dal medesimo soggetto o da un soggetto avente campo di variazione dell'età, stato patologico (cioè, stadio) simili al soggetto testato.

Descritta qui, una quantità efficace può significare una quantità sufficiente ad aumentare il livello di espressione di almeno un gene che è diminuito nel soggetto prima del trattamento o una quantità sufficiente ad alleviare uno o più sintomi del cancro. Per esempio, una quantità efficace

Marco Giovanni Mari  
USBM/CPI-090



è una quantità sufficiente ad aumentare il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare, e geni soppressori tumorali di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500%, o più in confronto a un valore di riferimento o al livello di espressione senza il trattamento di alcun composto.

Descritta qui, una quantità efficace può significare una quantità sufficiente a diminuire il livello di espressione di almeno un gene che è aumentato nel soggetto prima del trattamento o una quantità sufficiente ad alleviare uno o più sintomi del cancro. Per esempio, una quantità efficace è una quantità sufficiente a diminuire il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della via del riccio, MYC e EZH2 di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500%, o più in confronto a un valore di riferimento o al livello di espressione senza il trattamento di alcun composto.

La quantità efficace precisa per un soggetto dipenderà dal peso corporeo, dalla dimensione, e dalla salute del soggetto; la natura e la misura della condizione; e dall'agente terapeutico scelto per la somministrazione. Una quantità efficace per una data situazione può essere determinata mediante sperimentazione di routine che è nell'abilità e nel giudizio del medico.

E' qui descritto un procedimento per determinare l'efficacia di un trattamento per il cancro in un soggetto che ne necessita (a) misurando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare, e geni soppressori tumorali in un campione ottenuto dal soggetto, (b) confrontando il livello di espressione dell'almeno un gene nel passaggio (a) a un valore di riferimento o a una misurazione precedente, e (c) determinando l'efficacia del trattamento per il cancro sulla base del passaggio di confronto. Un trattamento per il cancro esemplare è somministrare un composto dell'invenzione al soggetto testato.

Il trattamento è efficace quando il soggetto testato ha un'espressione aumentata di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni dell'inibizione del ciclo cellulare, e geni soppressori tumorali 1) in confronto a un valore di riferimento o a una misurazione precedente; o 2) lungo il periodo di tempo in cui viene monitorato, come 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 giorni, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 settimane, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 mesi o più a lungo. Quando il trattamento esistente non è efficace, si dovrebbe cercare un nuovo trattamento o un dosaggio aumentato del trattamento esistente (per esempio, aumentando il dosaggio del composto somministrato al soggetto) per il soggetto testato.

E' qui descritto un procedimento per determinare l'efficacia di un trattamento per il cancro in un soggetto che ne necessita (a) misurando il livello di espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della via del riccio, geni della via myc e geni della istone

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

metiltransferasi in un campione ottenuto dal soggetto, (b) confrontando il livello di espressione dell' almeno un gene nel passaggio (a) a un valore di riferimento o a una misurazione precedente, e (c) determinando l'efficacia del trattamento per il cancro sulla base del passaggio di confronto. Un trattamento per il cancro esemplare è somministrare un inibitore di EZH2 dell'invenzione al soggetto testato.

Per esempio, il trattamento è efficace quando il soggetto testato ha un'espressione diminuita di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della via del riccio, geni della via myc e geni della istone metiltransferasi 1) in confronto a un valore di riferimento o a una misurazione precedente; o 2) lungo il periodo di tempo in cui viene monitorato, come 1, 2, 3, 4, 5, 6, o 7 giorni, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 settimane, o 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 mesi o più a lungo. Quando il trattamento esistente non è efficace, si dovrebbe cercare un nuovo trattamento o un dosaggio aumentato del trattamento esistente (per esempio, aumentando il dosaggio del composto somministrato al soggetto) per il soggetto testato.

In tutti i procedimenti presentati qui, il cancro è sarcoma epitelioide.

Come usato qui, il termine "responsività" è interscambiabile con i termini "responsivo", "sensibile", e "sensibilità", e significa che un soggetto mostra risposte terapeutiche quando gli viene somministrato un inibitore di EZH, per es., le cellule tumorali o i tessuti tumorali del soggetto subiscono apoptosi e/o necrosi, e/o mostrano una ridotta crescita, divisione, o proliferazione. Questo termine significa anche che un soggetto avrà o ha una più alta probabilità, rispetto alla popolazione in generale, di mostrare risposte terapeutiche quando gli viene somministrato un inibitore di EZH, per es., le cellule tumorali o i tessuti tumorali del soggetto subiscono apoptosi e/o necrosi, e/o mostrano una ridotta crescita, divisione, o proliferazione.

Come usato qui, un "soggetto" è interscambiabile con un "soggetto che ne necessita", entrambi i quali si riferiscono a un soggetto che ha un disturbo in cui la metilazione di proteine mediata da EZH2 gioca una parte, o un soggetto che ha un rischio aumentato di sviluppare tale disturbo rispetto alla popolazione in generale. Un soggetto che ne necessita può essere un soggetto che ha un disturbo associato al complesso SWI/SNF. Un soggetto che ne necessita può avere una condizione pre-cancerosa. Preferibilmente, un soggetto che ne necessita ha un cancro. Un soggetto che ne necessita può avere un cancro associato al complesso SWI/SNF. Un soggetto che ne necessita può avere un cancro associato alla perdita di funzione in almeno un componente del complesso SWI/SNF. In un aspetto preferito, un soggetto che ne necessita ha uno o più cancri scelti dal gruppo che consiste di sarcoma epitelioide.

Come usato qui, un "soggetto" include un mammifero. Il mammifero può essere per es., un essere umano o un mammifero non umano appropriato, come un primate, un topo, ratto, cane, gatto, vacca, cavallo, capra, cammello, pecora o maiale. Il soggetto può anche essere un uccello

o pollame. In una forma di attuazione, il mammifero è un essere umano. Un soggetto può essere maschio o femmina.

Un soggetto che ne necessita può essere uno che non è stato precedentemente diagnosticato o identificato per avere un cancro o una condizione pre-cancerosa. Un soggetto che ne necessita può essere uno che è stato precedentemente diagnosticato o identificato per avere un cancro o una condizione pre-cancerosa. Un soggetto che ne necessita può anche essere uno che ha (sta soffrendo di) un cancro o una condizione pre-cancerosa. Alternativamente, un soggetto che ne necessita può essere uno che è a rischio di sviluppare tale disturbo rispetto alla popolazione in generale (cioè, un soggetto che è predisposto a sviluppare tale disturbo rispetto alla popolazione in generale).

Facoltativamente un soggetto che ne necessita ha già subito, sta subendo o subirà, almeno un intervento terapeutico per il cancro o una condizione pre-cancerosa.

Un soggetto che ne necessita può avere un cancro refrattario alla terapia più recente. "Cancro refrattario" significa cancro che non risponde al trattamento. Il cancro può essere resistente all'inizio del trattamento o può diventare resistente durante il trattamento. Il cancro refrattario è anche chiamato cancro resistente. In alcune forme di attuazione, il soggetto che ne necessita ha una ricaduta del cancro successivamente alla remissione con la terapia più recente. In alcune forme di attuazione, il soggetto che ne necessita ha ricevuto e fallito tutte le terapie efficaci note per il trattamento del cancro. In alcune forme di attuazione, il soggetto che ne necessita ha ricevuto almeno una terapia precedente.

Un soggetto è uno che ha avuto, sta avendo o è predisposto a sviluppare un sarcoma epitelioide.

Descritto qui, un soggetto che ne necessita può avere un livello di espressione diminuito di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della differenziazione neuronale, geni di inibizione del ciclo cellulare, e geni soppressori tumorali.

Descritto qui, un soggetto che ne necessita può avere un livello di espressione aumentato di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di geni della via del riccio, geni della via di myc e geni di istone metiltransferasi.

Descritto qui, un soggetto che ne necessita può avere una perdita di funzione di almeno un componente/subunità del complesso SWI/SNF. Alternativamente, un soggetto che ne necessita ha ridotta espressione o aploinsufficienza di almeno un componente/subunità del complesso SWI/SNF. In certe forme di attuazione, un soggetto che ne necessita ha perdita di funzione della subunità SNF5.

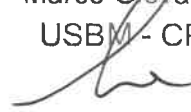
In qualsiasi procedimento descritto qui, un soggetto che ne necessita può avere ridotta espressione, aploinsufficienza o perdita di funzione di almeno un componente di segnalazione a valle del complesso SWI/SNF. Tale componente a valle include, ma non è limitato a, il complesso polycomb (PcG) e i suoi bersagli.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Come usato qui, il termine “perdita di funzione” si riferisce a minore o nessuna funzione di un prodotto genico/proteina in confronto al tipo selvatico. Perdita di funzione di un componente del complesso SWI/SNF significa che il componente/subunità o l’intero complesso SWI/SNF ha minore o nessuna funzione biologica in confronto alla componente/subunità di tipo selvatico o all’intero complesso di SWI/SNF, rispettivamente. La perdita di funzione può essere causata da meccanismi trascrizionali, post-trascrizione, o post-traduzionali. Per esempio, la perdita di funzione è causata da una mutazione per perdita di funzione risultata da una mutazione puntiforme (per es., una sostituzione, una mutazione missenso, o una mutazione non senso), un’inserzione, e/o una delezione in un polipeptide di un componente del complesso SWI/SNF o una sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide di un componente del complesso SWI/SNF. Le mutazioni riportate qui sono mutazioni somatiche. Il termine “mutazione somatica” si riferisce a una alterazione deleteria in almeno un allele del gene ce non si trova in ogni cellula del corpo, ma si trova solo in cellule isolate. Una caratteristica delle mutazioni somatiche come usato qui è, che sono limitate a particolari tessuti o persino parti di tessuti o cellule in un tessuto e non sono presenti nell’intero organismo che ospita i tessuti o le cellule. Il termine “di tipo selvatico” si riferisce a un gene o a un prodotto genico che ha le caratteristiche di quel gene o prodotto genico quando isolato da una fonte presente in natura. Un gene di tipo selvatico è quello che è più frequentemente osservato in una popolazione ed è pertanto arbitrariamente designato la forma “normale” o “di tipo selvatico” del gene.

Di conseguenza, una mutazione con perdita di funzione o una ridotta espressione può essere rivelata usando qualsiasi procedimento opportuno disponibile nella tecnica. Per esempio, una mutazione con perdita di funzione può essere rivelata misurando la funzione biologica di un prodotto genico, come l’attività di rimodellatura della cromatina ATP-dipendente del complesso SWI/SNF. Alternativamente, una mutazione con perdita di funzione può essere determinata rivelando qualsiasi alterazione in una sequenza di acido nucleico codificante un componente del complesso SWI/SNF. Per esempio, una sequenza di acido nucleico codificante un componente del complesso SWI/SNF avente una mutazione con perdita di funzione può essere rivelata mediante ri-sequenziamento dell’intero genoma o ri-sequenziamento della regione bersaglio (quest’ultimo anche noto come ri-sequenziamento mirato) usando fonti di DNA opportunamente selezionate e inneschi per reazione a catena della polimerasi (PCR) in conformità con procedimenti ben noti nella tecnica. Il procedimento tipicamente e generalmente comporta i passaggi di purificazione del DNA genomico, amplificazione PCR per amplificare la regione di interesse, sequenziamento a cicli, pulizia della reazione di sequenziamento, elettroforesi capillare, e/o analisi dei dati. Alternativamente o in aggiunta, il procedimento può includere l’uso di cattura e/o sequenziamento di DNA genomico di regioni mirate basato su microarray. Corredi, reagenti, e procedimenti per selezionare inneschi per PCR appropriati ed eseguire il ri-sequenziamento sono disponibili commercialmente, per esempio, da Applied Biosystems, Agilent, e NimbleGen (Roche Diagnostics GmbH).

Marco Giovanni Mari  
USBM - CP4-090



Alternativamente o in aggiunta, una sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide di SWI/SNF avente una mutazione con perdita di funzione può essere rivelata usando un Southern blot in conformità con procedimenti ben noti nella tecnica. Facoltativamente, una mutazione con perdita di funzione può essere rivelata misurando l'assenza di espressione di un polipeptide del componente o misurando l'espressione del polipeptide del componente mutante. La rivelazione dell'espressione del polipeptide (mutante) può essere effettuata con qualsiasi immunodosaggio opportuno nella tecnica, come l'analisi Western blot.

La sequenza di acido nucleico e di amminoacidi umana dei componenti del complesso SWI/SNF è stata descritta precedentemente. *Vedere, per es.*, i Numeri di Accessione GenBank NP\_003064.2, NM\_003073.3, NP\_001007469.1, e NM\_001007468.1 per SNF5, i Numeri di Accessione GenBank NM\_000489.3, NP\_000480.2, NM\_138270.2, e NP\_612114.1 per ATRX, i Numeri di Accessione GenBank NP\_006006.3, NM\_006015.4, NP\_624361.1, e NM\_139135.2 per ARID1A.

Lo spettro delle mutazioni somatiche hSNF5 nell'essere umano è stato anche descritto in Sevenet et al., Human Molecular Genetics, 8: 2359-2368, 1999.

Un soggetto che ne necessita può avere espressione ridotta, aploinsufficienza, e/o perdita di funzione di SNF5. Per esempio, un soggetto può comprendere una delezione di SNF5 nel polipeptide di SNF5 o una sequenza di acido nucleico codificante un polipeptide SNF5.

regolatore di cromatina SWI/SNF-correlato matrice-associato actina-dipendente subfamiglia B membro 1 isoforma a (SMARCB1, chiamato anche SNF5)

[Homo sapiens] (SEQ ID NO: 1)

```

121  LQKAKLNSQ WVPCLPSSN NDAVPESTC IHHMNGLAK KICLPICLDG NQAVVHENA
181  SQPEVLVPIR LDMEIDGQKL RDAFTWMNE KLMPPEMFSE ILCDLIDLNP LTFVPAIASA
241  IRQQIESYPT DSILEDQSDQ RVIIKLNIHV GNISLVDQFE WDMSEKENSF EKFAKLQSE
301  LGLGGEFVTT IAYSIRGQLS WHQKTYAFSE NPLPTVEIAI RNTGDADQWC PLLETLTDAE
361  MEKKIRDQDR NTRMRRLAN TAPAW

```

regolatore di cromatina SWI/SNF-correlato matrice-associato actina-dipendente subfamiglia b membro 1 di Homo sapiens (SMARCB1, anche chiamato

SNF5), variante del trascritto 1, mRNA (SEQ ID NO:2)

```

401  AAGGCTCTGY AAGTGGGAAGY GATCTCTGGAT GYCAATGATY AGAAGTACAA GGTCTGTCTC
541  ATCAGCACAG AGCCCCCAC CTACCTCAGG GAACAGAAGG CCAAGAGGAA CAGCCAGTGG
601  GTACCCACCC TGCCAACAG CTCCCACCAC TTAGATGCCG TGCCATGCTC CACAACCATC
661  AACAGGAACC GCATGGGCCG AGACAAGAAG AGAACCTTCC CCTTTGCTT TGATGACCAT
721  GACCCAGCTG TGATCCATGA GAACGCATCT CAGCCCGAGG TQCTGQTECC CATCCGQCTG

```

Marco Giovanfi Mari  
USBM-CPI-090

regolatore di cromatina SWI/SNF-correlato matrice-associato actina-dipendente subfamiglia B membro 1 isoforma a (SMARCB1, chiamato anche SNF5)

[Homo sapiens] (SEQ ID NO: 1)

```
1621 tttgtttttg tataggagcc ccaggcaggg ctagtaacag tttttaaata aaaggcaaca  
1681 ggtcatgttc aatttcttca acaaaaaaaaa aaaaaaa
```

regolatore di cromatina SWI/SNF-correlato matrice-associato actina-dipendente subfamiglia B membro 1 isoforma b [Homo sapiens] (SMARCB1, anche chiamato SNF5) (SEQ ID NO: 3)

```
181 rldmeidgqk lrdaftwnmn eklmtpemfs eilcddldln pltfvpaiaa airqqiesyp  
241 tdsiledqsd qrviiklnih vgnislvdqf ewdmsekens pekfalklcs elglggefvt  
301 tiaysirgqi swhqktyafs enplptveia irntgdadqw cplletlttda emekkirdd  
361 rntrrmrrla ntapaw
```

regolatore di cromatina SWI/SNF-correlato matrice-associato actina-dipendente subfamiglia b membro 1 di Homo sapiens (SMARCB1, anche chiamato SNF5), variante del trascritto 2, mRNA (SEQ ID NO:4)

```
1021 tgggacatgc cagagaagga gaattcaccg gagaagtctg cccctgaagct gtcctcggag  
1081 ctgggggttg gcggggagtt tgtcaccacc atcgcataca gcatccgggg acagctgagc  
1141 tggcatcaga agacctacgc cttcagcgag aaccctctgc ccacagtgga gattgccatc  
1201 cggaaacacgg gcgatgcgga ccagtgggtc cactgctgg agactctgac agacgctgag  
1261 atggagaaga agatccgcca ccaggacagg aacaacagggc ggatgaggcg tcttgccaac
```

```
1441 cccctgaggat cgggtggggg tggagtgggg gcttccaggtt ggcctctccc ggcacacatl  
1501 ccatttggtg agccccagtc ctgcccccca ccccaccctc cctaccctc cccagtctct  
1561 ggggtcagga agaaacotta ttttaggttg tgttttgtt ttgtatagga gccccaggca  
1621 gggctagtaa cagtttttaa ataaaaggca acaggtcatg ttcaatttct tcaacaaaaa  
1681 aaaaaaaaaa
```

Un soggetto che ne necessita può avere ridotta espressione, aploinsufficienza, e/o Perdita di funzione di ATRX. Per esempio, un soggetto può comprendere una mutazione scelta dal gruppo che consiste di una sostituzione di asparagine (N) per il residuo lisina di tipo selvatico (K) nella posizione aminoacidica 688 di SEQ ID NO: 5 (K688N), e una sostituzione di isoleucina (I) per il residuo metionina di tipo selvatico (M) nella posizione amminoacidica 366 di SEQ ID NO: 5 (M366I).

Sindrome alfa talassemia/ritardo mentale legata all'X di Homo sapiens (ATRX) isoforma 1 (SEQ ID NO: 5)

Marco Giovanqi Mari  
USBM-CPI-090


1601	kkrdlllyem	lagcvqikoy	caikriippk	neyvlavzml	siqcklyqyy	idnttgvgnl
1861	seggrgkaga	klfqdfqmls	riwthpwc1q	ldyiskenkg	yfdedsmdf	iasdsdetsm
1921	slssddytkk	kkkgkkgkkd	sssgsgsdn	dvevikvwns	rsrgggegngv	detgnnpsvs
1981	lkleeskats	ssnpsspapd	wykdfvtdad	aevlehsghm	vllfeilrma	eeigdkvlvf
2041	sqslisldli	edflelasre	ktedkdkpli	ykgegwlrn	idyyrldgst	taqsrkkwae
2281	ekkgltmrfn	iptgtnlppv	sfnsqtpyip	fnlgalsams	nqqledling	grekvveatn
2341	svtavriqpl	ediisavwke	nmnlseaqvq	alalsrqasq	eldvkrreai	yndvltkqgm
2401	liscvqirilm	nrrlqqqynq	qqqqqmtyyq	atlghlmpk	ppnlmnpn	yqqidmrgmy
2461	qpvagmqpp	plqrappmr	sknpgpsqgk	sm		

Sindrome alfa talassemia/ritardo mentale legata all'X di Homo sapiens (ATRX), variante del trascritto 1, mRNA (SEQ ID NO:6)

2341	ctctgacagt	gctatagata	atcttaagcc	caataadctg	ccadaatctc	agcaatcaga
2401	gactgtggat	caaaattcag	attctgatga	aatgctagca	atcctcaaag	aggtgagcag
2461	gatgagtcac	agttcttctt	cagatactga	tattaatgaa	atcatacaa	accataagac
2521	tttgtatgat	ttaaagactc	aggcgggaa	agatgataaa	ggaaaaagga	aacgaaaaag
2581	ttctacatct	qgctcaqatt	ttgatactaa	aaaqqqcaaa	tcagctaaqa	qctctataat
5761	gtgcaagctc	tatcaglacl	acttagatca	cttaacaggt	gcgggcaata	atagcgaag
5821	tggaagagga	aaggcaggtg	caaagctttt	ccaagatttt	cagatgttaa	gtagaatatg
5881	gactcatcct	tggtgtttgc	agctagacta	cattagcaaa	gaaaataagg	gttattttga
5941	tgaagacagt	atggatgaat	ttatagcctc	agattctgat	gaaacctcca	tgagttaaag
6001	ctccgatgat	tatacaaaaa	agaagaaaaa	agggaaaaag	gggaaaaaag	atagtagctc
9161	ctctgcttca	ggatcactcg	gattagaatg	agcttaacat	tagctaaaac	tgctttgag
9241	tgtttgatg	attaagagat	tgccattttt	atcttggaag	aactagtgg	aaaacatcca
9301	agagcactag	gattgtgata	cagaatttgt	gaggtttgg	ggatccacgc	ccctctccc
9361	cactttccca	tgatgaaata	tcactaataa	atcctgtata	tttagatatt	atgctagcca
9421	tgtaatcaga	tttatttaat	tggtggggc	aggtgtgtat	ttactttaga	aaaaatgaa
10921	atccccctca	catgcttact	atcttcaaaa	ctatgctcag	ggtattccat	actttatttc
10981	accagactca	gtctcaagtg	acttggctat	ctccaaatca	gatctacct	tagagaataa
11041	acatttttct	accgttattt	tttttcaagt	ctataatctg	agccagtc	aaaggagtga
11101	tcaagtttca	gaaatgcttt	catcttcaca	acattttata	tatactatta	tatggggtga
11161	ataaagtttt	aatccgaaa	tataaaaaaa	aaaaaaaaaa	aa	

Sindrome alfa talassemia/ritardo mentale legata all'X di Homo sapiens (ATRX), isoforma 2 (SEQ ID NO:7)

1001	edgchssaxl	lrrtelletl	hsssknlere	lqgysssaa	esssewkkk	nylsskkaa
1141	vivkekrkns	lrtstkrkqa	ditssssddi	edddqnsige	gssdeqkikp	vtenlvssh
1201	tgfcqssgde	alsksvpvtv	ddddndpe	nriakkmlle	eikanlssde	dgsdsdepee
1261	gkkrtgkqne	enpgdeekn	qvnsesdsds	eeskkpryrh	rllrhkltsv	dgesgeekkt
1321	kpkhkevkq	rnrrkvssed	sedsdqesg	vseevsesed	eqrprtrsak	kaeleenqrs

Marco Giovanni Mari  
  
 USBM - GPI-090

2101	tcmmrctctey	tlepdlldqp	nskkkkkrlc	pmprkctia	erlqlnkem	vyynenusr
2221	dhkeeeelte	eerkaawaey	eaekkgltmr	fniptgtnlp	pvsfnsqtpy	ipfnlgalsa
2281	msnqqlledli	nqgrekvvea	tnsvtavriq	plediisavw	kenmnlseaq	vqalalsrqa
2341	sqeldvkrre	aiyndvltkq	qmliscvqri	lmnrllqqqy	nqqqqqqmty	qqatlgllmm
2401	pkppnlmnp	snyqqidmrq	myqpvaggmq	ppplqrappp	mrsknpgpsq	gksm
Sindrome alfa talassemia/ritardo mentale legata all'X di Homo sapiens (ATRX), variante del trascritto 2, mRNA (SEQ ID NO:8)						
1701	ccccccagct	ccagaagaca	ccccgagaa	ccccgagact	gctatggaag	cccagagctc
1741	agttgatcat	caaggggatg	gcagcagtg	aaactgaacaa	gaagtggaga	gttcatctgt
1801	aaaattaaat	atctctcaa	aagacaacag	aggaggtatt	aatcaaaaa	ctacagctaa
1861	agtaacaaaa	gaattatatg	ttaaactcac	tcctgtttcc	ctttctaatt	ccccaattaa
1921	aggtgctgat	tgtcaggaag	ttccacaaga	taaagatggc	tataaaagt	gtggtctgaa
5101	ccccccaggag	agaagctaca	tcctgcagag	gcggcagaa	gatggctggg	ctatgatcat
5161	aggtatgatg	atgtatagaa	atcttgctca	aggaaggaat	gtgaagagtc	ggaaacttaa
5221	agaaatattt	aacaaagctt	tggttgatcc	aggccctgat	tttgttgttt	gtgatgaagg
5281	ccatattcta	aaaaatgaag	catctgctgt	ttctaaagct	atgaattcta	tacgatcaag
5341	gaggaagatt	attttaacag	gaacaccact	tcaaaataac	ctaattgaqt	atcattgtat
8521	ctctggctgt	caggtctaca	ccctgcttca	tadaaacctc	tadaatggca	gaaccattgc
8581	tgacttttag	ttcacatgag	gaatgtactt	ttaacaattc	ccagtactat	cagtattgtg
8641	aaataattcc	tctgaaagat	aagaatcact	ggcttctatg	cgcttctttt	ctctcatcat
8701	catgttcttt	tacccagtt	tccttacatt	tttttaaatt	gtttcagagt	ttgttttttt
8761	tttagtttag	attgtgagcc	aattattaaa	tcaaaattaa	ttcatccaat	accctttac
10801	caggtcaatt	ccccccatg	ttcattatac	tadaaatctc	gtccagggca	tttattactc
10861	tatttcacca	gactcagtet	caagtgaact	ggctatctcc	aaatcagatc	tacccttaga
10921	gaataaacat	tttctaccg	ttattttttt	tcaagtctat	aatctgagcc	agtcccaag
10981	gagtgatcaa	gtttcagaaa	tgctttcatc	ttcacaacat	tttatatata	ctattatatg
11041	gggtgaataa	agttttaaat	ccgaaatata	aaaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	

Un soggetto che ne necessita può avere espressione ridotta, aploinsufficienza, e/o perdita di funzione di ARID1A. Per esempio, un soggetto può comprendere una mutazione scelta dal gruppo che consiste di una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico cisteina (C) nella posizione amminoacidica 884 di SEQ ID NO: 11 (C884\*), una sostituzione di lisina (K) per il residuo di tipo selvatico acido glutammico (E) nella posizione amminoacidica 966 (E966K), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 1411 di SEQ ID NO: 11 (Q1411\*), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico fenilalanina (F)

Marco Giovanni Mari  
 USBM-CPL-090

nella posizione amminoacidica 1720 di SEQ ID NO: 11 (F1720fs), una mutazione per spostamento della griglia dopo il residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 1847 di SEQ ID NO: 11 (G1847fs), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico cisteina (C) nella posizione amminoacidica 1874 di SEQ ID NO: 11 (C1874fs), una sostituzione di acido glutammico (E) per il residuo di tipo selvatico acido aspartico (D) nella posizione amminoacidica 1957 (D1957E), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 1430 di SEQ ID NO: 11 (Q1430\*), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico arginina (R) nella posizione amminoacidica 1721 di SEQ ID NO: 11 (R1721fs), una sostituzione di acido glutammico (E) per il residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 1255 (G1255E), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 284 di SEQ ID NO: 11 (G284fs), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico arginina (R) nella posizione amminoacidica 1722 di SEQ ID NO: 11 (R1722\*), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico metionina (M) nella posizione amminoacidica 274 di SEQ ID NO: 11 (M274fs), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico glicina (G) nella posizione amminoacidica 1847 di SEQ ID NO: 11 (G1847fs), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico P nella posizione amminoacidica 559 di SEQ ID NO: 11 (P559fs), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico arginina (R) nella posizione amminoacidica 1276 di SEQ ID NO: 11 (R1276\*), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 2176 di SEQ ID NO: 11 (Q2176fs), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico istidina (H) nella posizione amminoacidica 203 di SEQ ID NO: 11 (H203fs), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico alanina (A) nella posizione amminoacidica 591 di SEQ ID NO: 11 (A591fs), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 1322 di SEQ ID NO: 11 (Q1322\*), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico serina (S) nella posizione amminoacidica 2264 di SEQ ID NO: 11 (S2264\*), una mutazione non senso per il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 586 di SEQ ID NO: 11 (Q586\*), una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico glutammina (Q) nella posizione amminoacidica 548 di SEQ ID NO: 11 (Q548fs), e una mutazione per spostamento della griglia presso il residuo di tipo selvatico asparagina (N) nella posizione amminoacidica 756 di SEQ ID NO: 11 (N756fs). "\*" usato qui si riferisce a un codone di arresto. "fs" usato qui si riferisce a uno spostamento della griglia

Proteina 1A contenente dominio interattivo ricco in AT (ARID1A) isoforma a [Homo sapiens] (SEQ ID NO: 9)

```

101  LAAIQGGGGY GTEPYGGPQY NSNADYLPIM QYNSYYPNLS AYPPEPAPYA TSSPIGGGPPY
241  SGAAAAGSK PPPSSASAS SSSSSFAQR FGAMGGGGPS AAGGGTPQPT ATPTLNQLLT
301  SPSSARGYQG YPGGDYSGGP QDGGAGKQPA DNASQCWGA AAAAAAAAAA SGGAAQRSHHA
361  PMSPGSSGGG GQPLARTPQP SSPMDQMGKM RPPYGGTNP YSQQQGGPPSG PQQGHGYPGQ
421  PYGSQTPQRY PMTMQGRAQS AMGGLSYTCQ IPPYGGQGPS GYGGQGGQTPY YNQQSPHPQQ

```

Marco Giovanni Mari  
 USBM  GPI-090

2041 vscnkvevww uclemlienc ivtlanllegq iulspypesl tipvloglil wavcpasaaq  
 2101 dpfstlqgna vlspqrlvie tlsklisqdn nvdliilatpp fsrleklyst mvrflsdrkn  
 2161 pvcremavvl lanlaqgds1 aaraiavqkg signllgfle dslaatqfqq sqasllhmqn  
 2221 ppfeptsvdm mrraaralla lakvdenhse ftlyesrllid isvsp1mns1 vsqv1cdvlf  
 2281 ligqs

**Dominio interattivo ricco in AT 1A (SWI-simile) (ARID1A) di Homo sapiens, variante del trascritto 1, mRNA (SEQ ID NO: 10)**

901 acaaaagccct ggccctggcag cgtcgcagag cggcggcggc gggggccctgg agccctacgc  
 961 ggggccccag cagaactctc acgaccacgg cttccccaac caccagtaca actcctacta  
 1021 ccccaaccgc agcgcctacc ccccgcccgc cccggcctac gcgctgagct ccccgagagg  
 1081 tggcactccg ggctccggcg cggcggcggc tgccggetcc aagccgcctc cctcctccag  
 1141 cqctccqcc cctcctcctt cctcctcctt cctcctcctt cctcctcctt cctcctcctt

4321 ggggatgcat tctcctagcc gctaccccc gcagcagcag cagcagcagc agcaatgaca  
 4381 tgattcctat ggcaatcagt tctccacca aggaccacct tctggcagcc ccttccccag  
 4441 ccagcagact acaatgtatc aacagcaaca gcagaattac aagcggccaa tggatggcac  
 4501 atatggccct cctgccaagg ggcacgaagg ggagatgtac agcgtgccat acagcactgg  
 4561 qcaqqqqcag cctcaqcaqc acaqattqcc cccaqcccag cccaqccctq ccaqccaqca

7741 gaagtlcgcg gtlcglgaca gaccctgctc actggagagc cctcglcagc agagtlcaga  
 7801 cccttccatg tactgtactg tacacctgat actgtaaaca tactgtaata ataatgtctc  
 7861 acatggaaac agaaaacgct gggtcagcag caagctgtag tttttaaaaa tgtttttagt  
 7921 taaacgttga ggagaaaaaa aaaaaaggct tttcccccac agtatcatgt gtgaacctac  
 7981 aacaccctga cctcttctc tctcctctga ttgtatqaat aacctgaga tcacctctta

8341 ccttctcaat cyagylgcyg aaaaagctca gylcagctc agylcttcat gaagaaacac  
 8401 aattgagatt ttttcagtga taaaatctgc atatttgtat ttcaacaatg tagctaaaac  
 8461 ttgatgtaaa ttctccttt ttttctttt ttggcttaat gaatcatt tattcagtat  
 8521 gaaatcttta tactatatgt tccacgtgtt aagaataaat gtacattaaa tcttggtaag  
 8581 acttt

**Proteina 1A contenente dominio interattivo ricco in AT (ARID1A) isoforma b (SEQ ID NO: 11)**

1801 mknperkqa ptyexeeeq uqyvscnkve wwwuclemli encivtlanl sqqlulspyp  
 1861 esiclpvldg llhwavcpa eaqdpfstlg pnavlspqrl vletlsklis qdnnvdliia  
 1921 tppfsrlek1 ystmvrflsd rknpvcrema vlllanlaqq dslaaraiav qkgsignllg  
 1981 fledslaatq fqqsqasllh mqnppfepts vdmrraara llalakvden hseftlyesr  
 2041 lldisvsp1m nslvsqv1cd vlfligqs

**Dominio interattivo ricco in AT 1A (SWI-simile) (ARID1A) di Homo sapiens, variante del trascritto 2, mRNA (SEQ ID NO: 12)**

Marco Giovanni Mari  
 USBM-CR-090

1	cagaaagcgg	agagtcacag	cggggccagg	cctggggag	cggagcctcc	accgcccccc
61	tcattcccag	gcaaggcctt	ggggggaatg	agccgggaga	gccgggtccc	gagcctacag
121	agccqqqagc	agctgaqccg	ccqccqccctc	qccqccqcc	qccqccctct	cctcctccgc
3301	cccagccacc	aaaatgaca	acaaagcaga	ctggacaccc	agaacagaa	ccaaatccaa
3361	gaaatccagt	tcttctacta	caaccaatga	gaagatcacc	aagttgtatg	agctgggtgg
3421	tgagcctgag	aggaagatgt	gggtggaccg	ttatctggcc	ttcactgagg	agaaggccat
3481	gggcatgaca	aatctgcctg	ctgtgggtag	gaaacctctg	gacctctatc	gcctctatgt
3541	qtctgtgaaq	gaqattqgtg	qattqactca	qgtcaacaaq	aacaaaaaat	qccqggaact
6721	ctctctctgt	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct	ctctctctct
6781	ttccttgtec	tcacctact	ccctcagga	ccctacccca	ccctcttga	aaagacaaaag
6841	ctctgcctac	atagaagact	ttttttat	taaccaaagt	tactgttgtt	tacagtgagt
6901	ttggggaaaa	aaaataaaat	aaaatggct	ttcccagtc	ttgcatcaac	gggatgccac
6961	atttcataac	tgttttaaat	qgtaaaaaaa	aaaaaaaaaa	atacaaaaaa	aaattctgaa
7681	gctctgctct	ctctctctct	gaggtctgaa	aaagctctct	gctctgctct	agctctgctct
7741	aagaaacaca	attgagattt	tttcagtgat	aaaatctgca	tatttgtatt	tcaacaatgt
7801	agctaaaact	tgatgtaaat	tcctcctttt	ttcctttttt	tggcttaatg	aatatcattt
7861	attcagtatg	aaatctttat	actatatgtt	ccacgtgtta	agaataaatg	tacattaat
7921	cttggttaaga	cttt				

Sono qui descritti procedimenti per indurre la differenziazione neuronale mettendo in contatto una cellula con un composto (cioè un inibitore di EZH2) dell'invenzione. Per esempio, il composto è in una quantità sufficiente ad aumentare l'espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di CD133 (anche chiamato PROM1), DOCK4, PTPRK, PROM2, LHX1, LHX6, LHX9, PAX6, PAX7, VEFGA, FZD3B, FYN, HIF1A, HTRA2, EVX1, CCDC64, e GFAP.

Il termine "indurre la differenziazione neuronale" usato qui si riferisce a spingere una cellula a svilupparsi in una cellula della stirpe neuronale come risultato di un effetto diretto o intenzionale sulla cellula.

Sono qui descritti procedimenti per indurre l'inibizione del ciclo cellulare mettendo in contatto una cellula con un composto dell'invenzione. Per esempio, il composto è in una quantità sufficiente ad aumentare l'espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di CKDN1A, CDKN2A, MEN1, CHEK1, IRF6, ALOX15B, CYP27B1, DBC1, NME6, GMNN, HEXIM1, LATS1, MYC, HRAS, TGFB1, IFNG, WNT1, TP53, THBS1, INHBA, IL8, IRF1, TPR, BMP2, BMP4, ETS1, HPGD, BMP7, GATA3, NR2F2, APC, PTPN3, CALR, IL12A, IL12B, PML, CDKN2B, CDKN2C, CDKN1B, SOX2, TAF6, DNA2, PLK1, TERF1, GAS1, CDKN2D, MLF1, PTEN, TGFB2, SMAD3, FOXO4, CDK6,

Marco Giovanni Mari  
 USBM-CRI-090

TFAP4, MAP2K1, NOTCH2, FOXC1, DLG1, MAD2L1, ATM, NAE1, DGKZ, FHL1, SCRIB, BTG3, PTPRK, RPS6KA2, STK11, CDKN3, TBRG1, CDC73, THAP5, CRLF3, DCUN1D3, MYOCD, PAF1, LILRB1, UHMK1, PNPT1, USP47, HEXIM2, CDK5RAP1, NKX3-1, TIPIN, PCBP4, USP44, RBM38, CDT1, RGCC, RNF167, CLSPN, CHMP1A, WDR6, TCF7L2, LATS2, RASSF1, MLTK, MAD2L2, FBXO5, ING4, e TRIM35.

Il termine “indurre l’inibizione del ciclo cellulare” usato qui si riferisce a causare un accumulo o un arresto in qualsiasi fase durante la divisione e/o la duplicazione cellulare.

Sono qui descritti procedimenti per indurre la soppressione tumorale mettendo in contatto una cellula con un composto dell’invenzione. Per esempio, il composto è in una quantità sufficiente ad aumentare l’espressione di BIN1 o di qualsiasi soppressore tumorale.

Il termine “indurre la soppressione tumorale” può includere, ma non è limitato a, una riduzione nelle dimensioni di un tumore, una riduzione nel volume del tumore, una diminuzione nel numero di tumori, una diminuzione nel numero di lesioni metastatiche in altri tessuti od organi distanti dal sito del tumore primario, un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione che riceve il solo veicolante, un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione di soggetti non trattati, un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione che riceve una monoterapia con un farmaco che non è un composto della presente invenzione, una diminuzione nel tasso di mortalità di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione che riceve il veicolante da solo, una diminuzione nel tasso di crescita del tumore, o una diminuzione nel tasso di ricrescita del tumore.

Sono qui descritti procedimenti per inibire la segnalazione riccio mettendo in contatto una cellula con un composto dell’invenzione. Per esempio, il composto è in una quantità sufficiente a ridurre l’espressione di almeno un gene scelto dal gruppo che consiste di GLI1, PTCH1, SUFU, KIF7, GLI2, BMP4, MAP3K10, SHH, TCTN3, DYRK2, PTCHD1, e SMO.

La frase “inibire la segnalazione riccio” significa che la forza (intensità) della segnalazione riccio con il trattamento con un composto è ridotta di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500%, o più in confronto alla forza (intensità) della segnalazione riccio senza alcun trattamento con un composto.

Sono qui descritti procedimenti per indurre un’espressione genica mettendo in contatto una cellula con un composto dell’invenzione. Per esempio, il composto è in una quantità sufficiente a indurre differenziazione neuronale, inibizione del ciclo cellulare e/o soppressione tumorale. Tale gene è scelto dal gruppo che consiste di CD133 (chiamato anche PROM1), DOCK4, PTPRK, PROM2, LHX1, LHX6, LHX9, PAX6, PAX7,

Marco Giovanni Mari  
USBM/CP/090

VEFGA, FZD3B, FYN, HIF1A, HTRA2, EVX1, CCDC64, GFAP, CKDN1A, CDKN2A, MEN1, CHEK1, IRF6, ALOX15B, CYP27B1, DBC1, NME6, GMNN, HEXIM1, LATS1, MYC, HRAS, TGFB1, IFNG, WNT1, TP53, THBS1, INHBA, IL8, IRF1, TPR, BMP2, BMP4, ETS1, HPGD, BMP7, GATA3, NR2F2, APC, PTPN3, CALR, IL12A, IL12B, PML, CDKN2B, CDKN2C, CDKN1B, SOX2, TAF6, DNA2, PLK1, TERF1, GAS1, CDKN2D, MLF1, PTEN, TGFB2, SMAD3, FOXO4, CDK6, TFAP4, MAP2K1, NOTCH2, FOXC1, DLG1, MAD2L1, ATM, NAE1, DGKZ, FHL1, SCRIB, BTG3, PTPRK, RPS6KA2, STK11, CDKN3, TBRG1, CDC73, THAP5, CRLF3, DCUN1D3, MYOCD, PAF1, LILRB1, UHMK1, PNPT1, USP47, HEXIM2, CDK5RAP1, NKX3-1, TIPIN, PCBP4, USP44, RBM38, CDT1, RGCC, RNF167, CLSPN, CHMP1A, WDR6, TCF7L2, LATS2, RASSF1, MLTK, MAD2L2, FBXO5, ING4, TRIM35, BIN1 e qualsiasi soppressore tumorale.

La frase "indurre un'espressione genica" significa che il livello di espressione di un particolare gene di interesse è aumentato di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500%, o più in confronto al livello di espressione di questo gene senza alcun trattamento con composto.

Sono qui descritti procedimenti per inibire un'espressione genica comprendenti mettere in contatto una cellula con un composto dell'invenzione. Per esempio, il composto è in una quantità sufficiente a inibire la segnalazione riccio. Tale gene è GLI1, PTCH1, SUFU, KIF7, GLI2, BMP4, MAP3K10, SHH, TCTN3, DYRK2, PTCHD1, o SMO.

La frase "inibire un'espressione genica" significa che il livello di espressione di un particolare gene di interesse è ridotto di almeno il 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 100%, 200%, 300%, 400%, 500%, 1000%, 1500%, o più in confronto al livello di espressione di questo gene senza alcun trattamento con un composto.

La differenziazione neuronale, l'inibizione del ciclo cellulare, la soppressione tumorale e l'inibizione della segnalazione riccio possono essere determinate mediante qualsiasi procedimento noto nella tecnica.

Come usato qui, una cellula si riferisce a qualsiasi cellula che può essere ottenuta e usata mediante un procedimento descritto qui. Per esempio, una cellula può essere ottenuta da una coltura cellulare. Alternativamente, una cellula può essere isolata da un soggetto. Una cellula può anche riferirsi a una cellula di un soggetto.

Una cellula può comprendere la perdita di funzione di SNF5, ARID1A, ATRX, e/o un componente del complesso SWI/SNF. Preferibilmente, una cellula può comprendere una delezione di SNF5.

Una cellula può essere una cellula cancerosa, dove il cancro è sarcoma epitelioido.

Un cancro che deve essere trattato può essere stadiato secondo il sistema di classificazione American Joint Committee on Cancer (AJCC)

Marco Giovanni Mari  
USBM-EPI-090

TNM, dove al tumore (T) è stato assegnato uno stadio di TX, T1, T1mic, T1a, T1b, T1c, T2, T3, T4, T4a, T4b, T4c, o T4d; e dove ai linfonodi regionali (N) è stato assegnato uno stadio di NX, N0, N1, N2, N2a, N2b, N3, N3a, N3b, o N3c; e dove alle metastasi distanti (M) può essere assegnato uno stadio di MX, M0, o M1. Un cancro che deve essere trattato può essere stadiato secondo il sistema di classificazione American Joint Committee on Cancer (AJCC) come Stadio I, Stadio IIA, Stadio IIB, Stadio IIIA, Stadio IIIB, Stadio IIIC, o Stadio IV. A un cancro che deve essere trattato può essere assegnato un grado secondo una classificazione AJCC come Grado GX (*per es.*, il grado non può essere accertato), Grado 1, Grado 2, Grado 3 o Grado 4. Un cancro che deve essere trattato può essere stadiato secondo una classificazione patologica AJCC (pN) di pNX, pN0, PN0 (I-), PN0 (I+), PN0 (mol-), PN0 (mol+), PN1, PN1(mi), PN1a, PN1b, PN1c, pN2, pN2a, pN2b, pN3, pN3a, pN3b, o pN3c.

Un cancro che deve essere trattato può essere valutato mediante citometria del DNA, citometria a flusso, o citometria per immagini. Un cancro che deve essere trattato può essere tipizzato per avere 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90% di cellule nello stadio di sintesi della divisione cellulare (*per es.*, nella fase S della divisione cellulare). Un cancro che deve essere trattato può essere tipizzato per avere una bassa frazione in fase S o un'alta frazione in fase S.

Come usato qui, una "cellula normale" è una cellula che non può essere classificata come parte di un "disturbo proliferativo cellulare". Una cellula normale manca di crescita irregolare o anomala, o di entrambe, che può portare allo sviluppo di una condizione o di una patologia indesiderata. Preferibilmente, una cellula normale possiede meccanismi di controllo del punto di controllo del ciclo cellulare normalmente funzionanti.

Come usato qui, "mettersi in contatto con una cellula" si riferisce a una condizione in cui un composto o altra composizione di materia è in contatto diretta con una cellula, o è abbastanza vicino da indurre un effetto biologico desiderato in una cellula.

Come usato qui, "monoterapia" si riferisce alla somministrazione di un singolo composto attivo o terapeutico a un soggetto che ne necessita. Preferibilmente, la monoterapia implicherà la somministrazione di una quantità terapeuticamente efficace di un composto attivo. Per esempio, la monoterapia per il cancro con uno dei composti della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo, solvato, analogo o derivato farmaceuticamente accettabile, a un soggetto che necessita di trattamento per il cancro. La monoterapia può essere contrastata con la terapia in combinazione, in cui è somministrata una combinazione di molteplici composti attivi, preferibilmente con ogni componente della combinazione presente in una quantità terapeuticamente efficace. In un aspetto, la monoterapia con un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo o solvato, è più efficace della terapia in combinazione nell'indurre un effetto biologico desiderato.

Come usato qui, "trattando" o "trattare" descrive la gestione e la cura di un paziente con lo scopo di combattere una patologia, una

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

condizione, o un disturbo e include la somministrazione di un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo o solvato, per alleviare uno o più sintomi o complicazioni di una patologia, condizione o disturbo, o per eliminare la patologia, condizione o disturbo. Il termine “trattare” può anche includere il trattamento di una cellula *in vitro* o di un modello animale.

Un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo o solvato farmaceuticamente accettabile, può anche essere usato per prevenire una patologia, condizione o disturbo, o usato per identificare candidati opportuni per tali scopi. Come usato qui, “prevenendo” o “prevenire” descrive il ridurre o eliminare l’esordio dei sintomi o delle complicazioni della patologia, condizione o disturbo.

Come usato qui, il termine “alleviare” è inteso per descrivere un processo mediante il quale viene diminuita la gravità di un segno o di un sintomo di un disturbo. In maniera importante, un segno o un sintomo può essere alleviato senza essere eliminato. In una forma di attuazione preferita, la somministrazione di composizioni farmaceutiche dell’invenzione porta all’eliminazione di un segno o un sintomo, tuttavia, l’eliminazione non è richiesta. Ci si aspetta che dosaggi efficaci diminuiscano la gravità di un segno o di un sintomo. Per esempio, un segno o un sintomo di un disturbo come il cancro, che può verificarsi in molteplici localizzazioni, viene alleviato se la gravità del cancro è diminuita in almeno una delle molteplici localizzazioni.

Come usato qui, il termine “gravità” è inteso per descrivere il potenziale del cancro di trasformarsi da uno stato pre-canceroso, o benigno, in uno stato maligno. Alternativamente, o in aggiunta, la gravità è intesa per descrivere uno stadio di un cancro, per esempio secondo il sistema TNM (accettato dalla International Union Against Cancer (UICC) e dall’American Joint Committee on Cancer (AJCC)) o mediante altri procedimenti riconosciuti nella tecnica. Lo stadio del cancro si riferisce all’estensione o alla gravità del cancro, sulla base di fattori come la posizione del tumore primario, le dimensioni del tumore, il numero di tumori, e il coinvolgimento dei linfonodi (diffusione del cancro nei linfonodi). Alternativamente, o in aggiunta, la gravità è intesa per descrivere il grado del tumore mediante procedimenti riconosciuti nella tecnica (vedere, National Cancer Institute, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Il grado del tumore è un sistema usato per classificare le cellule cancerose in termini di come appaiono anomale al microscopio e di come velocemente il tumore è probabile che cresca e si diffonda. Molti fattori vengono considerati quando si determina il grado di un tumore, incluso lo schema di struttura e crescita delle cellule. I fattori specifici usati per determinare il grado del tumore variano con ogni tipo di cancro. La gravità descrive anche un grado istologico, chiamato anche differenziazione, che si riferisce a quanto le cellule tumorali assomigliano alle cellule normali del medesimo tipo di tessuto (vedere, National Cancer Institute, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)). Inoltre, la gravità descrive un grado nucleare, che si riferisce alle dimensioni e alla forma del nucleo nelle cellule tumorali e alla percentuale di cellule tumorali che si stanno dividendo (vedere, National Cancer Institute, [www.cancer.gov](http://www.cancer.gov)).

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

Descritto qui, la gravità descrive il grado in cui un tumore ha secreto fattori di crescita, degradato la matrice extracellulare, diventato vascolarizzato, perso adesione ai tessuti affiancati, o metastatizzato. Inoltre, la gravità descrive il numero di localizzazioni in cui un tumore primario ha metastatizzato. Infine, la gravità include a difficoltà di trattare i tumori di tipi e localizzazioni variabili. Per esempio, i tumori inoperabili, quei cancri che hanno maggiore accesso a molteplici sistemi corporei (i tumori ematici e immunologici), e quelli che sono i più resistenti ai trattamenti tradizionali sono considerati i più gravi. In queste situazioni, prolungare l'aspettativa di vita del soggetto e/o ridurre il dolore, diminuire la proporzione di cellule cancerose o limitare le cellule a un sistema, e migliorare lo stadio del cancro/il grado del tumore/il grado istologico/il grado nucleare sono considerati alleviare un segno o un sintomo del cancro.

Come usato qui il termine "sintomo" è identificato come un'indicazione di patologia, malattia, lesione, o che qualcosa non è a posto nel corpo. I sintomi sono provati o notati dall'individuo che sperimenta il sintomo, ma possono non essere facilmente notati da altri. Gli altri sono definiti da professionisti non dell'ambito sanitario.

Come usato qui il termine "segno" è anche definito come un'indicazione che qualcosa non è a posto nel corpo. Ma i segni sono definiti come cose che possono essere viste da un dottore, un'infermiera, o altri professionisti dell'ambito sanitario.

Il cancro è un gruppo di patologie che possono causare quasi ogni segno o sintomo. I segni e i sintomi dipenderanno da dove è il cancro, dalle dimensioni del cancro, e da quanto esso influenza gli organi o le strutture vicini. Se un cancro si diffonde (metastatizza), i sintomi possono comparire in parti differenti del corpo.

Trattare il cancro può risultare in una riduzione nelle dimensioni di un tumore. Una riduzione nelle dimensioni di un tumore può anche essere riportata come "regressione tumorale". Preferibilmente, dopo un trattamento, le dimensioni del tumore sono ridotte del 5% o più rispetto alle dimensioni prima del trattamento; più preferibilmente, le dimensioni del tumore sono ridotte del 10% o più; più preferibilmente, ridotte del 20% o più; più preferibilmente, ridotte del 30% o più; più preferibilmente, ridotte del 40% o più; ancora più preferibilmente, ridotte del 50% o più; e nel modo più preferibile, ridotte di più del 75% o più. Le dimensioni di un tumore possono essere misurate mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Le dimensioni di un tumore possono essere misurate come il diametro del tumore.

Trattare il cancro può risultare in una riduzione del volume del tumore. Preferibilmente, dopo un trattamento, il volume del tumore è ridotto del 5% o più rispetto alla sua dimensione prima del trattamento; più preferibilmente, il volume del tumore è ridotto del 10% o più; più preferibilmente, ridotto del 20% o più; più preferibilmente, ridotto del 30% o più; più preferibilmente, ridotto del 40% o più; ancora più preferibilmente, ridotto del 50% o più; e nel modo più preferibile, ridotto di più del 75% o più. Il volume del tumore può essere misurato mediante

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile.

Trattare il cancro risulta in una diminuzione nel numero di tumori. Preferibilmente, dopo un trattamento, il numero di tumori è ridotto del 5% o più rispetto al numero prima del trattamento; più preferibilmente, il numero di tumori è ridotto del 10% o più; più preferibilmente, ridotto del 20% o più; più preferibilmente, ridotto del 30% o più; più preferibilmente, ridotto del 40% o più; ancora più preferibilmente, ridotto del 50% o più; e nel modo più preferibile, ridotto di più del 75%. Il numero di tumori può essere misurato mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Il numero di tumori può essere misurato contando i tumori visibili a occhio nudo o a un ingrandimento specificato. Preferibilmente, l'ingrandimento specificato è 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, o 50x.

Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nel numero di lesioni metastatiche in altri tessuti o organi distanti dal sito del tumore primario. Preferibilmente, dopo un trattamento, il numero di lesioni metastatiche è ridotto del 5% o più rispetto al numero prima del trattamento; più preferibilmente, il numero di lesioni metastatiche è ridotto del 10% o più; più preferibilmente, ridotto del 20% o più; più preferibilmente, ridotto del 30% o più; più preferibilmente, ridotto del 40% o più; ancora più preferibilmente, ridotto del 50% o più; e nel modo più preferibile, ridotto di più del 75%. Il numero di lesioni metastatiche può essere misurato mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Il numero di lesioni metastatiche può essere misurato contando le lesioni metastatiche visibili a occhio nudo o a un ingrandimento specificato. Preferibilmente, l'ingrandimento specificato è 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, o 50x.

Trattare il cancro può risultare in un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione che riceve il veicolante da solo. Preferibilmente, il tempo di sopravvivenza medio è aumentato di più di 30 giorni; più preferibilmente, di più di 60 giorni; più preferibilmente, di più di 90 giorni; e nel modo più preferibile, di più di 120 giorni. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può essere misurato mediante qualsiasi mezzo riproducibile. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può essere misurato, per esempio, calcolando per una popolazione la lunghezza media di sopravvivenza successivamente all'inizio del trattamento con un composto attivo. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può essere misurato, per esempio, calcolando per una popolazione la lunghezza media di sopravvivenza successivamente al completamento di un primo giro di trattamento con un composto attivo.

Trattare il cancro può risultare in un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione di soggetti non trattati. Preferibilmente, il tempo di sopravvivenza medio è aumentato di più di 30 giorni; più preferibilmente, di più di 60 giorni; più preferibilmente, di più di 90 giorni; e nel modo più preferibile, di più di 120 giorni. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

una popolazione può essere misurato mediante qualsiasi mezzo riproducibile. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può essere misurato, per esempio, calcolando per una popolazione la lunghezza media di sopravvivenza successivamente all'inizio del trattamento con un composto attivo. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può anche essere misurato, per esempio, calcolando per una popolazione la lunghezza media di sopravvivenza successivamente al completamento di un primo giro di trattamento con un composto attivo.

Trattare il cancro può risultare in un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione ricevente una monoterapia con un farmaco che non è un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo, solvato, analogo o derivato farmaceuticamente accettabile. Preferibilmente, il tempo di sopravvivenza medio è aumentato di più di 30 giorni; più preferibilmente, di più di 60 giorni; più preferibilmente, di più di 90 giorni; e nel modo più preferibile, di più di 120 giorni. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può essere misurato mediante qualsiasi mezzo riproducibile. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può essere misurato, per esempio, calcolando per una popolazione la lunghezza media di sopravvivenza successivamente all'inizio del trattamento con un composto attivo. Un aumento nel tempo di sopravvivenza medio di una popolazione può anche essere misurato, per esempio, calcolando per una popolazione la lunghezza media di sopravvivenza successivamente al completamento di un primo giro di trattamento con un composto attivo.

Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nel tasso di mortalità di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione ricevente il veicolante da solo. Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nel tasso di mortalità di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione non trattata. Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nel tasso di mortalità di una popolazione di soggetti trattati in confronto a una popolazione ricevente una monoterapia con un farmaco che non è un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo o solvato farmaceuticamente accettabile. Preferibilmente, il tasso di mortalità è diminuito di più del 2%; più preferibilmente, di più del 5%; più preferibilmente di più del 10%; e nel modo più preferibile, di più del 25%. Una diminuzione nel tasso di mortalità di una popolazione di soggetti trattati può essere misurata mediante qualsiasi mezzo riproducibile. Una diminuzione nel tasso di mortalità di una popolazione di soggetti trattati può essere misurata, per esempio, calcolando per una popolazione il numero medio di morti correlate alla patologia per unità di tempo successivamente all'inizio di un trattamento con un composto attivo. Una diminuzione nel tasso di mortalità di una popolazione di soggetti trattati può essere misurata, per esempio, calcolando per una popolazione il numero medio di morti correlate alla patologia per unità di tempo successivamente al completamento di un primo giro di trattamento con un composto attivo.

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPI-090

Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nel tasso di crescita del tumore. Preferibilmente, dopo un trattamento, il tasso di crescita del tumore è ridotto di almeno il 5% rispetto al numero prima del trattamento; più preferibilmente, il tasso di crescita del tumore è ridotto di almeno il 10%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 20%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 30%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 40%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 50%; ancora più preferibilmente, ridotto di almeno il 50%; e nel modo più preferibile, ridotto di almeno il 75%. Il tasso di crescita del tumore può essere misurato mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Il tasso di crescita del tumore può essere misurato secondo un cambiamento nel diametro del tumore per unità di tempo.

Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nel tasso di ricrescita del tumore. Preferibilmente, dopo un trattamento, la ricrescita del tumore è meno del 5%; più preferibilmente, la ricrescita del tumore è meno del 10%; più preferibilmente, è meno del 20%; più preferibilmente, è meno del 30%; più preferibilmente, è meno del 40%; più preferibilmente, è meno del 50%; ancora più preferibilmente, è meno del 50%; e nel modo più preferibile, è meno del 75%. La ricrescita del tumore può essere misurata mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. La ricrescita del tumore è misurata, per esempio, misurando un aumento nel diametro di un tumore dopo un primo restringimento del tumore che ha seguito il trattamento. Una diminuzione nella ricrescita del tumore è indicata dal fallimento del tumore a riverificarsi dopo che il trattamento è stato arrestato.

Trattare il cancro può risultare in una riduzione nel tasso di proliferazione cellulare. Preferibilmente, dopo un trattamento, il tasso di proliferazione cellulare è ridotto di almeno il 5%; più preferibilmente, di almeno il 10%; più preferibilmente, di almeno il 20%; più preferibilmente, di almeno il 30%; più preferibilmente, di almeno il 40%; più preferibilmente, di almeno il 50%; ancora più preferibilmente, di almeno il 50%; e nel modo più preferibile, di almeno il 75%. Il tasso di proliferazione cellulare può essere misurato mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Il tasso di proliferazione cellulare è misurato, per esempio, misurando il numero di cellule in divisione in un campione di tessuto per unità di tempo.

Trattare il cancro può risultare in una riduzione nella proporzione di cellule proliferanti. Preferibilmente, dopo un trattamento, la proporzione di cellule proliferanti è ridotta di almeno il 5%; più preferibilmente, di almeno il 10%; più preferibilmente, di almeno il 20%; più preferibilmente, di almeno il 30%; più preferibilmente, di almeno il 40%; più preferibilmente, di almeno il 50%; ancora più preferibilmente, di almeno il 50%; e nel modo più preferibile, di almeno il 75%. La proporzione di cellule proliferanti può essere misurata mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Preferibilmente, la proporzione di cellule proliferanti è misurata, per esempio, quantificando il numero di cellule in divisione rispetto al numero di cellule non in divisione in un campione di tessuto. La proporzione di cellule proliferanti può essere equivalente

all'indice mitotico.

Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nella dimensione di un'area o zona di proliferazione cellulare. Preferibilmente, dopo un trattamento, la dimensione di un'area o zona di proliferazione cellulare è ridotta di almeno il 5% rispetto alla sua dimensione prima del trattamento; più preferibilmente, ridotta di almeno il 10%; più preferibilmente, ridotta di almeno il 20%; più preferibilmente, ridotta di almeno il 30%; più preferibilmente, ridotta di almeno il 40%; più preferibilmente, ridotta di almeno il 50%; ancora più preferibilmente, ridotta di almeno il 50%; e nel modo più preferibile, ridotta di almeno il 75%. La dimensione di un'area o zona di proliferazione cellulare può essere misurata mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. La dimensione di un'area o zona di proliferazione cellulare può essere misurata come diametro o ampiezza di un'area o zona di proliferazione cellulare.

Trattare il cancro può risultare in una diminuzione nel numero o proporzione di cellule aventi un aspetto o una morfologia anomalo. Preferibilmente, dopo un trattamento, il numero di cellule aventi una morfologia anomala è ridotto di almeno il 5% rispetto alla sua dimensione prima del trattamento; più preferibilmente, ridotto di almeno il 10%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 20%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 30%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 40%; più preferibilmente, ridotto di almeno il 50%; ancora più preferibilmente, ridotto di almeno il 50%; e nel modo più preferibile, ridotto di almeno il 75%. Un aspetto cellulare o una morfologia anomala può essere misurato mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Una morfologia cellulare anomala può essere misurata mediante il microscopio, per es., usando un microscopio invertito per coltura tissutale. Una morfologia cellulare anomala può prendere la forma di pleiomorfismo nucleare.

Trattare il cancro può risultare nella morte cellulare, e preferibilmente, la morte cellulare risulta in una diminuzione di almeno il 10% nel numero di cellule in una popolazione. Più preferibilmente, la morte cellulare significa una diminuzione di almeno il 20%; più preferibilmente, una diminuzione di almeno il 30%; più preferibilmente, una diminuzione di almeno il 40%; più preferibilmente, una diminuzione di almeno il 50%; nel modo più preferibile, una diminuzione di almeno il 75%. Il numero di cellule in una popolazione può essere misurato mediante qualsiasi mezzo di misurazione riproducibile. Il numero di cellule in una popolazione può essere misurato mediante separazione cellulare attivata da fluorescenza (FACS), microscopia in immunofluorescenza e microscopia ottica. I procedimenti per misurare la morte cellulare sono come mostrato in Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 100(5): 2674-8, 2003. In un aspetto, la morte cellulare si verifica per apoptosi.

Come usato qui, il termine "selettivamente" significa tendente a verificarsi a una frequenza più alta in una popolazione piuttosto che in un'altra popolazione. Le popolazioni confrontate possono essere popolazioni di cellule. Preferibilmente, un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, agisce selettivamente su una cellula cancerosa o pre-cancerosa ma non su una

Marco Giovanni Mari  
USPM - GPL090

cellula normale. Preferibilmente, un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, agisce selettivamente per modulare un bersaglio molecolare (per es., una proteina metiltransferasi bersaglio) ma non modula significativamente alcun altro bersaglio molecolare (per es., una proteina metiltransferasi non bersaglio). L'invenzione fornisce anche un procedimento per inibire selettivamente l'attività di un enzima, come una proteina metiltransferasi. Preferibilmente, un evento si verifica selettivamente nella popolazione A rispetto alla popolazione B se si verifica più di due volte più frequentemente nella popolazione A in confronto alla popolazione B. Un evento si verifica selettivamente se si verifica più di cinque volte più frequentemente nella popolazione A. Un evento si verifica selettivamente se si verifica più di dieci volte più frequentemente nella popolazione A; più preferibilmente, più di cinquanta volte; ancora più preferibilmente, più di 100 volte; e nel modo più preferibile, più di 1000 volte più frequentemente nella popolazione A in confronto alla popolazione B. Per esempio, la morte cellulare si direbbe che si verifica selettivamente nelle cellule cancerose se si verificasse più di due volte frequentemente nelle cellule cancerose in confronto alle cellule normali.

Un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, può modulare l'attività di un bersaglio molecolare (per es., proteina metiltransferasi bersaglio). Modulare si riferisce a stimolare o inibire un'attività di un bersaglio molecolare. Per esempio, un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, modula l'attività di un bersaglio molecolare se stimola o inibisce l'attività del bersaglio molecolare di almeno 2 volte rispetto all'attività del bersaglio molecolare nelle medesime condizioni ma privo soltanto della presenza di detto composto. Per esempio, un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, modula l'attività di un bersaglio molecolare se stimola o inibisce l'attività del bersaglio molecolare di almeno 5 volte, almeno 10 volte, almeno 20 volte, almeno 50 volte, almeno 100 volte rispetto all'attività del bersaglio molecolare nelle medesime condizioni ma privo soltanto della presenza di detto composto. L'attività di un bersaglio molecolare può essere misurata mediante qualsiasi mezzo riproducibile. L'attività di un bersaglio molecolare può essere misurata *in vitro* o *in vivo*. Per esempio, l'attività di un bersaglio molecolare può essere misurata *in vitro* mediante un saggio dell'attività enzimatica o un saggio di legame al DNA, o l'attività di un bersaglio molecolare può essere misurata *in vivo* saggiando l'espressione di un gene reporter.

Un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, non modula significativamente l'attività di un bersaglio molecolare se l'aggiunta del composto non stimola o inibisce l'attività del bersaglio molecolare di più del 10% rispetto all'attività del bersaglio molecolare nelle medesime condizioni ma privo soltanto della presenza di detto composto.

Come usato qui, il termine "isozima selettivo" significa l'inibizione o la stimolazione preferenziale di una prima isoforma di un enzima in

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

confronto a una seconda isoforma di un enzima (per es., l'inibizione o la stimolazione preferenziale di un proteina metiltransferasi isozima alfa in confronto a un proteina metiltransferasi isozima beta). Preferibilmente, un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, dimostra un minimo di un differenziale di quattro volte, preferibilmente un differenziale di dieci volte, più preferibilmente un differenziale di cinquanta volte, nel dosaggio richiesto per ottenere un effetto biologico. Preferibilmente, un composto della presente invenzione, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, dimostra questo differenziale attraverso il campo di variazione dell'inibizione, e il differenziale è esemplificato alla  $IC_{50}$ , cioè, un'inibizione del 50%, per un bersaglio molecolare di interesse.

Somministrare un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, a una cellula o a un soggetto che ne necessita può risultare nella modulazione (cioè, stimolazione o inibizione) di un'attività di una proteina metiltransferasi di interesse.

La rivelazione della metilazione di H3-K27, la formazione di H3-K27 trimetilato, la conversione di H3-K27 mono-metilato a H3-K27 di-metilato, o la conversione di H3-K27 di-metilato in H3-K27 trimetilato può essere effettuata usando qualsiasi procedimento opportuno. Procedimenti esemplari si possono trovare in US20120071418.

Somministrare un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, a una cellula o a un soggetto che ne necessita può risultare nella modulazione (cioè, stimolazione o inibizione) di un'attività di un bersaglio intracellulare (per es., un substrato). Parecchi bersagli intracellulari possono essere modulati con i composti della presente invenzione, incluso, ma non limitato a, proteina metiltransferasi.

Per esempio, una quantità efficace di un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, non è significativamente citotossica per le cellule normali. Una quantità terapeuticamente efficace di un composto non è significativamente citotossica per le cellule normali se la somministrazione del composto in una quantità terapeuticamente efficace non induce la morte cellulare in più del 10% delle cellule normali. Una quantità terapeuticamente efficace di un composto non influisce significativamente la vitalità di cellule normali se la somministrazione del composto in una quantità terapeuticamente efficace non induce la morte cellulare in più del 10% delle cellule normali. In un aspetto, la morte cellulare si verifica per apoptosi.

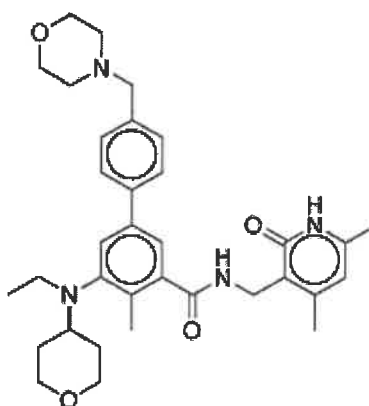
Mettere in contatto una cellula con un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, può indurre o attivare la morte cellulare selettivamente nelle cellule cancerose. Somministrare a un soggetto che ne necessita un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, può indurre o attivare la morte cellulare selettivamente nelle cellule cancerose. Mettere in contatto una cellula con un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, può indurre la

Marco Giovanni Mari  
USBN-CPI-090

morte cellulare selettivamente in una o più cellule affette da un disturbo proliferativo cellulare. Preferibilmente, somministrare a un soggetto che ne necessita un composto descritto qui, o un suo sale, polimorfo, o solvato farmaceuticamente accettabile, induce la morte cellulare selettivamente in una o più cellule affette da un disturbo proliferativo cellulare.

Uno esperto nella tecnica può fare riferimento a testi di riferimento generali per le descrizioni dettagliate di tecniche note discusse qui o di tecniche equivalenti. Questi testi includono Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc. (2005); Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (3a edizione), Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (2000); Coligan et al., *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Enna et al., *Current Protocols in Pharmacology*, John Wiley & Sons, N.Y.; Fingl et al., *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (1975), Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 18a edizione (1990). Questi testi possono, certamente, anche essere usati come riferimento nel realizzare o utilizzare un aspetto dell'invenzione.

Il composto che può essere usato in ogni procedimento presentato qui è:



(Composto A), suoi stereoisomeri o suo sale o solvato farmaceuticamente accettabile.

I composti descritti qui possono essere sintetizzati secondo qualsiasi procedimento noto nella Tecnica. Per esempio, i composti aventi Formula (VII) possono essere sintetizzati secondo il procedimento descritto in WO 2011/140325; WO 2011/140324; e WO 2012/005805.

Come usato qui, "alchile", "C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub> alchile" o "C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> alchile" si intende che includa gruppi idrocarburici alifatici saturi a catena dritta (lineare) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub> e gruppi idrocarburici alifatici saturi ramificati C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub>. Per esempio, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> si intende che includa gruppi C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub> alchile. Esempi di alchile includono, porzioni aventi da uno a sei atomi di carbonio, come, ma non limitato a, metile, etile, n-propile, i-propile, n-butile, s-butile, t-butile, n-pentile, s-pentile o n-esile.

In certe forme di attuazione, un alchile a catena lineare o ramificata ha sei o meno atomi di carbonio (per es., C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> per la catena lineare, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> per la catena ramificata), e in un'altra forma di attuazione, un alchile a catena lineare o ramificata ha quattro o

meno atomi di carbonio.

Come usato qui, il termine "cicloalchile" si riferisce a un sistema idrocarburico non aromatico saturo o insaturo mono- o multi-anello (per es., anelli fusi, a ponte, o spiro) avente da 3 a 30 atomi di carbonio (per es., C<sub>3</sub>-C<sub>10</sub>). Esempi di cicloalchile includono, ma non sono limitati a, ciclopropile, ciclobutile, ciclopentile, cicloesile, cicloeptile, ciclottile, ciclopentenile, cicloesenile, cicloeptenile, e adamantile. Il termine "eterocicloalchile" si riferisce a un sistema ad anello monociclico saturo o non saturo non aromatico a 3-8 elementi, biciclico a 7-12 elementi (anelli fusi, a ponte, o spiro), o triciclico a 11-14 elementi (anelli fusi, a ponte, o spiro) avente uno o più eteroatomi (come O, N, S, o Se), se non altrimenti specificato. Esempi di gruppi di eterocicloalchile includono, ma non sono limitati a, piperidinile, piperazinile, pirrolidinile, diossanile, tetraidrofuranile, isoindolinile, indolinile, imidazolidinile, pirazolidinile, ossazolidinile, isossazolidinile, triazolidinile, tetraidrofuranile, ossiranile, azetidile, ossetanile, tietanile, 1,2,3,6-tetraidropiridinile, tetraidropiranile, diidropiranile, piranile, morfolinile, 1,4-diazepanile, 1,4-ossazepanile, 2-ossa-5-azabicyclo[2.2.1]eptanile, 2,5-diazabicyclo[2.2.1]eptanile, 2-ossa-6-azaspiro[3.3]eptanile, 2,6-diazaspiro[3.3]eptanile, 1,4-diossa-8-azaspiro[4.5]decanile e simili.

Il termine "alchile facoltativamente sostituito" si riferisce a un alchile non sostituito o a un alchile avente sostituenti designati che rimpiazzano uno o più atomi di idrogeno su uno o più carboni dello scheletro idrocarburico. Tali sostituenti possono includere, per esempio, alchile, alchenile, alchinile, alogeno, idrossile, alchilcarbonilossi, arilcarbonilossi, alcossicarbonilossi, arilossicarbonilossi, carbossilato, alchilcarbonile, arilcarbonile, alcossicarbonile, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, dialchilamminocarbonile, alchiltiocarbonile, alcossile, fosfato, fosfonato, fosfinato, ammino (inclusi alchilammino, dialchilammino, arilammino, diarilammino e alchilarilammino), acilammino (inclusi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido), amidino, imino, solfidrile, alchiltio, ariltio, tiocarbossilato, solfati, alchilsolfinile, solfonato, solfamoile, solfonamido, nitro, trifluorometile, ciano, azido, eterociclice, alchilarile, o una porzione aromatica o eteroaromatica.

Una porzione "arilalchile" o una "aralchile" è un alchile sostituito con un arile (per es., fenilmetil (benzile)). Una porzione "alchilarile" è un arile sostituito con un alchile (per es., metilfenile).

Come usato qui, "linker alchilico" si intende che includa gruppi idrocarburici alifatici divalenti saturi a catena dritta (lineare) C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub> e gruppi idrocarburici alifatici saturi ramificati C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> o C<sub>6</sub>. Per esempio, un linker alchilico C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> si intende che include gruppi linker alchilici C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> e C<sub>6</sub>. Esempi di linker alchilico includono, porzioni aventi da uno a sei atomi di carbonio, come, ma non limitato, metile (-CH<sub>2</sub>-), etile (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), n-propile (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), i-propile (-CHCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>-), n-butile (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), s-butile (-CHCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), i-butile (-C(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), n-pentile (-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-), s-pentile (-CHCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-) o n-esile (-

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPI-090

CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-).

"Alchenile" include gruppi alifatici insaturi analoghi in lunghezza e una possibile sostituzione agli alchili descritti sopra, ma che contengono almeno un doppio legame. Per esempio, il termine "alchenile" include gruppi alchenilici a catena lineare (per es., etenile, propenile, butenile, pentenile, esenile, eptenile, ottenile, nonenile, decenile), e gruppi alchenilici ramificati. In certe forme di attuazione, un gruppo alchenilico a catena lineare o ramificato ha sei o meno atomi di carbonio nel suo scheletro (per es., C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> per la catena lineare, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> per la catena ramificata). Il termine "C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" include gruppi alchenilici contenenti da tre a sei atomi di carbonio.

Il termine "alchenile facoltativamente sostituito" si riferisce a un alchenile non sostituito o a un alchenile avente sostituenti designati che rimpiazzano uno o più atomi di idrogeno su uno o più atomi di carbonio dello scheletro idrocarburico. Tali sostituenti possono includere, per esempio alchile, alchenile, alchinile, alogeno, idrossile, alchilcarbonilossi, arilcarbonilossi, alcossicarbonilossi, arilossicarbonilossi, carbossilato, alchilcarbonile, arilcarbonile, alcossicarbonile, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, dialchilamminocarbonile, alchiltiocarbonile, alcossile, fosfato, fosfonato, fosfinato, ammino (inclusi alchilammino, dialchilammino, arilammino, diarilammino e alchilarilammino), acilammino (inclusi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido), amidino, imino, solfidrile, alchiltio, ariltio, tiocarbossilato, solfati, alchilsolfinile, solfonato, solfamoile, solfonamido, nitro, trifluorometile, ciano, azido, eterociclile, alchilarile, o una porzione aromatica o eteroaromatica.

"Alchinile" include gruppi alifatici insaturi analoghi in lunghezza e una possibile sostituzione agli alchili descritti sopra, ma che contengono almeno un triplo legame. Per esempio, "alchinile" include gruppi alchinilici a catena lineare, (per es., etinile, propinile, butinile, pentinile, esinile, eptinile, ottinile, noninile, decinile), e gruppi alchinilici ramificati. In certe forme di attuazione, un gruppo alchenilico a catena lineare o ramificato ha sei o meno atomi di carbonio nel suo scheletro (per es., C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub> per la catena lineare, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub> per la catena ramificata). Il termine "C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>" include gruppi alchinilici contenenti da tre a sei atomi di carbonio.

Il termine "alchinile facoltativamente sostituito" si riferisce a un alchinile non sostituito o a un alchinile avente sostituenti designati che rimpiazzano uno o più atomi di idrogeno su uno o più atomi di carbonio dello scheletro idrocarburico. Tali sostituenti possono includere, per esempio alchile, alchenile, alchinile, alogeno, idrossile, alchilcarbonilossi, arilcarbonilossi, alcossicarbonilossi, arilossicarbonilossi, carbossilato, alchilcarbonile, arilcarbonile, alcossicarbonile, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, dialchilamminocarbonile, alchiltiocarbonile, alcossile, fosfato, fosfonato, fosfinato, ammino (inclusi alchilammino, dialchilammino, arilammino, diarilammino e alchilarilammino), acilammino (inclusi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido), amidino, imino, solfidrile, alchiltio, ariltio, tiocarbossilato, solfati, alchilsolfinile, solfonato, solfamoile, solfonamido, nitro, trifluorometile, ciano, azido, eterociclile, alchilarile, o una porzione aromatica o eteroaromatica.

Altre porzioni facoltativamente sostituite (come cicloalchile, eterocicloalchile, arile, o eteroarile) includono sia le porzioni non sostituite sia le porzioni aventi uno o più dei sostituenti designati. Per esempio, eterocicloalchile sostituito include quelli sostituiti con uno o più gruppi alchilici, come 2,2,6,6-tetrametile-piperidinile e 2,2,6,6-tetrametile-1,2,3,6-tetraidropiridinile.

“Arile” include gruppi con aromaticità, inclusi sistemi “coniugati”, o multiciclici con almeno un anello aromatico e non contengono alcun eteroatomo nella struttura ad anello. Gli esempi includono fenile, benzile, 1,2,3,4-tetraidronaftalenile, ecc.

I gruppi “eteroarilici” sono gruppi arilici, come definito sopra, eccetto per avere da uno a quattro eteroatomi nella struttura ad anello, e possono anche essere riportati come “aril eterocicli” o “eteroaromatici.” Come usato qui, il termine “eteroarile” è inteso che include un anello eterociclico aromatico stabile monociclico a 5, 6, o 7 elementi o biciclico a 7, 8, 9, 10, 11 o 12 elementi che consiste di atomi di carbonio e uno o più eteroatomi, per es., 1 o 1-2 o 1-3 o 1-4 o 1-5 o 1-6 eteroatomi, o per es., 1, 2, 3, 4, 5, o 6 eteroatomi, scelti in maniera indipendente dal gruppo che consiste di azoto, ossigeno e zolfo. L’atomo di azoto può essere sostituito o non sostituito (cioè, N o NR in cui R è H o altri sostituenti, come definito). Gli eteroatomi di azoto e di zolfo possono facoltativamente essere ossidati (cioè, N→O e S(O)<sub>p</sub>, dove p = 1 o 2). Si deve notare che il numero totale di atomi S e O nell’eterociclo aromatico non è più di 1.

Esempi di gruppi eteroarilici includono pirrolo, furano, tiofene, tiazolo, isotiazolo, imidazolo, triazolo, tetrazolo, pirazolo, ossazolo, isossazolo, piridina, pirazina, piridazina, pirimidina, e simili.

Inoltre, i termini “arile” e “eteroarile” includono gruppi arilici ed eteroarilici multiciclici, per es., triciclici, biciclici, per es., naftalene, benzossazolo, benzodiossazolo, benzotiazolo, benzoimidazolo, benzotiofene, metilenediossifenile, chinolina, isochinolina, naftridina, indolo, benzofurano, purina, benzofurano, deazapurina, indolizina.

Nel caso di anelli aromatici multiciclici, solo uno degli anelli deve essere aromatico (per es., 2,3-diidroindolo), sebbene tutti gli anelli possano essere aromatici (per es., chinolina). Il secondo anello può anche essere fuso o collegato a ponte.

L’anello di cicloalchile, eterocicloalchile, arile, o eteroarile può essere sostituito in una o più posizioni dell’anello (per es., il carbonio che forma l’anello o l’eteroatomo come N) con sostituenti tali a quelli descritti sopra, per esempio, alchile, alchenile, alchinile, alogeno, idrossile, alchilcarbonilossi, arilcarbonilossi, alcossicarbonilossi, arilossicarbonilossi, carbossilato, alchilcarbonile, arilcarbonile, alcossicarbonile, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, dialchilamminocarbonile, alchiltiocarbonile, alcossile, fosfato, fosfonato, fosfinato, ammino (inclusi alchilammino, dialchilammino, arilammino, diarilammino e alchilarilammino), acilammino (inclusi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido), amidino, imino, solfidrile, alchiltio, ariltio, tiocarbossilato, solfati, alchilsolfenile, solfonato, solfamoile, solfonamido, nitro,

Marco Giovanni Mari  
USBME GRL090

trifluorometile, ciano, azido, eterocicliche, alchilarile, o una porzione aromatica o eteroaromatica. I gruppi arilici ed eteroarilici possono anche essere fusi o collegati a ponte con anelli aliciclici o eterociclici, che non sono aromatici così da formare un sistema multiciclico (per es., tetralina, metilenediossifenile).

Come usato qui, "carbociclo" o "anello carbociclico" si intende che includa qualsiasi anello stabile monociclico, biciclico o triciclico avente il numero specificato di atomi di carbonio, ognuno dei quali può essere saturo, insaturo, o aromatico. Carbociclo include cicloalchile e arile. Per esempio, un carbociclo C<sub>3</sub>-C<sub>14</sub> si intende che includa un anello monociclico, biciclico o triciclico avente 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 14 atomi di carbonio. Esempi di carbocicli includono, ma non sono limitati a, ciclopropile, ciclobutile, ciclobutenile, ciclopentile, ciclopentenile, cicloesile, cicloeptenile, cicloeptile, cicloeptenile, adamantile, cicloottile, cicloottenile, cicloottadienile, fluorenile, penile, naftile, indanile, adamantile e tetraidronaftile. Gli anelli collegati a ponte sono anche inclusi nella definizione di carbociclo, inclusi, per esempio, [3.3.0]bicycloottano, [4.3.0]bicyclononano, [4.4.0]bicyclodecano e [2.2.2]bicycloottano. Un anello collegato a ponte si verifica quando uno o più atomi di carbonio collegano due atomi di carbonio non adiacenti. In una forma di attuazione, gli anelli collegati a ponte sono uno o due atomi di carbonio. Si è notato che un ponte converte sempre un anello monociclico in un anello triciclico. Quando un anello è collegato a ponte, i sostituenti elencati per l'anello possono anche essere presenti sul ponte. Gli anelli fusi (per es., naftile, tetraidronaftile) e spiro sono anche inclusi.

Come usato qui, "eterociclo" o "gruppo eterociclico" include qualsiasi struttura ad anello (saturo, insaturo, o aromatico) che contiene almeno un eteroatomo dell'anello (per es., N, O o S). Eterociclo include eterocicloalchile e eteroarile. Esempi di eterocicli includono, ma non sono limitati a, morfolina, pirrolidina, tetraidrotiofene, piperidina, piperazina, ossetano, pirano, tetraidropirano, azetidina, e tetraidrofurano.

Esempi di gruppi eterociclici includono, ma non sono limitati a, acridinile, azocinile, benzimidazolile, benzofuranile, benzotiofuranile, benzotiofenile, benzossazolile, benzossazolinile, benzotiazolile, benzotriazolile, benzotetrazolile, benzisossazolile, benzisotiazolile, benzimidazolinile, carbazolile, 4*aH*-carbazolile, carbolinile, cromanile, cromenile, cinnolinile, decaidrochinolinile, 2*H*,6*H*-1,5,2-ditiazinile, diidrofuro[2,3-*b*]tetraidrofurano, furanile, furazanile, imidazolidinile, imidazolinile, imidazolile, 1*H*-indazolile, indolenile, indolinile, indolizininile, indolile, 3*H*-indolile, isatinoile, isobenzofuranile, isocromanile, isoindazolile, isoindolinile, isoindolile, isochinolinile, isotiazolile, isossazolile, metilenediossifenile, morfolinile, naftiridinile, ottaidroisochinolinile, ossadiazolile, 1,2,3-ossadiazolile, 1,2,4-ossadiazolile, 1,2,5-ossadiazolile, 1,3,4-ossadiazolile, 1,2,4-ossadiazol5(4*H*)-one, ossazolidinile, ossazolile, ossindolile, pirimidinile, fenantridinile, fenantrolinile, fenazinile, fenotiazinile, fenossatinile, fenossazinile, ftalazinile, piperazinile, piperidinile, piperidonile, 4-piperidonile, piperonile, pteridinile, purinile, piranile, pirazinile, pirazolidinile, pirazolinile, pirazolile, piridazinile, piridoossazolo, piridoimidazolo, piridotiazolo, piridinile, piridile, pirimidinile,

Marco Giovanni Mari  
USBM @PI-090

pirrolidinile, pirrolinile, 2H-pirrolile, pirrolile, chinazolinile, chinolinile, 4H-chinolinile, chinossalinile, chinuclidinile, tetraidrofuranile, tetraidroisochinolinile, tetraidrochinolinile, tetrazolile, 6H-1,2,5-tiadiazinile, 1,2,3-tiadiazolile, 1,2,4-tiadiazolile, 1,2,5-tiadiazolile, 1,3,4-tiadiazolile, tiantrenile, tiazolile, tienile, tienotiazolile, tienoossazolile, tienoimidazolile, tiofenile, triazinile, 1,2,3-triazolile, 1,2,4-triazolile, 1,2,5-triazolile, 1,3,4-triazolile e xantenile.

Il termine "sostituito", come usato qui, significa che uno qualsiasi o più atomi di idrogeno sull'atomo designato è rimpiazzato con una selezione dai gruppi indicati, a condizione che non sia superata la valenza normale dell'atomo designato, e che la sostituzione risulti in un composto stabile. Quando un sostituito è osso o cheto (cioè, =O), allora sull'atomo sono rimpiazzati 2 atomi di idrogeno. I sostituiti cheto non sono presenti sulle porzioni aromatiche. I doppi legami dell'anello, come usato qui, sono doppi legami che si sono formati tra due atomi adiacenti dell'anello (per es., C=C, C=N o N=N). "Composto stabile" e "struttura stabile" si intende che indichino un composto che è sufficientemente robusto per sopravvivere all'isolamento a un grado di purezza utile da una miscela di reazione, e la formulazione in un agente terapeutico efficace.

Quando un legame a un sostituito è mostrato che attraversa un legame che connette due atomi in un anello, allora tale sostituito può essere legato a qualsiasi atomo nell'anello. Quando un sostituito è elencato senza indicare l'atomo tramite il quale il sostituito è legato al resto del composto di una data formula, allora tale sostituito può essere legato tramite qualsiasi atomo in tale formula. Sono permesse combinazioni di sostituiti e/o variabili, ma solo se tali combinazioni risultano in composti stabili.

Quando qualsiasi variabile (per es., R<sub>1</sub>) occorre più di una volta in qualsiasi costituente o formula per un composto, la sua definizione in ogni occorrenza è indipendente dalla sua definizione in ogni altra occorrenza. Per tanto, per esempio, se si mostra che un gruppo è sostituito con 0-2 porzioni R<sub>1</sub>, allora il gruppo può facoltativamente essere sostituito con fino a due porzioni R<sub>1</sub> e R<sub>1</sub> in ogni occorrenza è scelto in maniera indipendente dalla definizione di R<sub>1</sub>. Inoltre, sono permesse combinazioni di sostituiti e/o variabili, ma solo se le combinazioni risultano in composti stabili.

Il termine "idrossi" o "idrossile" include gruppi con -OH o -O<sup>-</sup>.

Come usato qui, "alo" o "alogeno" si riferisce a fluoro, cloro, bromo e iodio. Il termine "peralogenato" si riferisce generalmente a una porzione in cui tutti gli atomi di idrogeno sono rimpiazzati da atomi di alogeno. Il termine "aloalchile" o "aloalossile" si riferisce a un alchile o a un alossile sostituito con uno o più atomi di alogeno.

Il termine "carbonile" include composti e porzioni che contengono un carbonio connesso con un doppio legame a un atomo di ossigeno. Esempi di porzioni contenenti un carbonile includono, ma non sono limitati a, aldeidi, chetoni, acidi carbossilici, amidi, esteri, anidridi, ecc.

Marco Giovanni Mari  
WSEB-CPI-090

Il termine "carbossile" si riferisce a -COOH o al suo estere C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>.

"Acile" include porzioni che contengono il radicale acile (R-C(O)-) o un gruppo carbonile. "Acile sostituito" include gruppi acilici dove uno o più degli atomi di idrogeno sono rimpiazzati da, per esempio, gruppi alchilici, gruppi alchinilici, alogeno, idrossile, alchilcarbonilossi, arilcarbonilossi, alcossicarbonilossi, arilossicarbonilossi, carbossilato, alchilcarbonile, arilcarbonile, alcossicarbonile, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, dialchilamminocarbonile, alchiltiocarbonile, alcossile, fosfato, fosfonato, fosfinato, ammino (inclusi alchilammino, dialchilammino, arilammino, diarilammino e alchilarilammino), acilammino (inclusi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido), amidino, imino, solfidrile, alchiltio, ariltio, tiocarbossilato, solfati, alchilsolfinile, solfonato, solfamoile, solfonamido, nitro, trifluorometile, ciano, azido, eterociclice, alchilarile, o una porzione aromatica o eteroaromatica.

"Aroile" include porzioni con una porzione arilica o eteroaromatica legata a un gruppo carbonile. Esempi di gruppi aroilici includono fenilcarbossi, naftil carbossi, ecc.

"Alcossialchile," "alchilamminalchile," e "tioalcossialchile" includono gruppi alchilici, come descritto sopra, in cui atomi di ossigeno, azoto, o zolfo rimpiazzano uno o più atomi di carbonio dello scheletro idrocarburico.

Il termine "alcossi" o "alcossile" include gruppi alchilici, alchenilici e alchinilici sostituiti e non sostituiti collegati in maniera covalente a un atomo di ossigeno. Esempi di gruppi alcossi o di radicali alcossilici includono, ma non sono limitati a, gruppi metossi, etossi, isopropilossi, propossi, butossi e pentossi. Esempi di gruppi alcossi sostituiti includono gruppi alcossi alogenati. I gruppi alcossi possono essere sostituiti con gruppi come alchenile, alchinile, alogeno, idrossile, alchilcarbonilossi, arilcarbonilossi, alcossicarbonilossi, arilossicarbonilossi, carbossilato, alchilcarbonile, arilcarbonile, alcossicarbonile, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, dialchilamminocarbonile, alchiltiocarbonile, alcossile, fosfato, fosfonato, fosfinato, ammino (inclusi alchilammino, dialchilammino, arilammino, diarilammino e alchilarilammino), acilammino (inclusi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido), amidino, imino, solfidrile, alchiltio, ariltio, tiocarbossilato, solfati, alchilsolfinile, solfonato, solfamoile, solfonamido, nitro, trifluorometile, ciano, azido, eterociclice, alchilarile, o una porzione aromatica o eteroaromatica. Esempi di gruppi alcossi sostituiti con alogeni includono, ma non sono limitati a, fluorometossi, difluorometossi, trifluorometossi, clorometossi, diclorometossi e triclorometossi.

Il termine "etere" o "alcossi" include composti o porzioni che contengono un ossigeno legato a due atomi di carbonio o eteroatomi. per esempio, il termine include "alcossialchile", che si riferisce a un gruppo alchilico, alchenilico, o alchinilico legato in maniera covalente a un atomo di ossigeno che è legato in maniera covalente a un gruppo alchilico.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Il termine "estere" include composti o porzioni che contengono un atomo di carbonio o un eteroatomo legato a un atomo di ossigeno che è legato al carbonio di un gruppo carbonile. Il termine "estere" include gruppi alcossicarbonili come metossicarbonile, etossicarbonile, propossicarbonile, butossicarbonile, pentossicarbonile, ecc.

Il termine "tioalchile" include composti o porzioni che contengono un gruppo alchilico connesso con un atomo di zolfo. I gruppi tioalchilici possono essere sostituiti con gruppi come alchile, alchenile, alchinile, alogeno, idrossile, alchilcarbonilossi, arilcarbonilossi, alcossicarbonilossi, arilossicarbonilossi, carbossilato, alchilcarbonile, arilcarbonile, alcossicarbonile, amminocarbonile, alchilamminocarbonile, dialchilamminocarbonile, alchiltiocarbonile, alcossile, fosfato, fosfonato, fosfinato, ammino (inclusi alchilammino, dialchilammino, arilammino, diarilammino e alchilarilammino), acilammino (inclusi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido), amidino, imino, solfidrile, alchiltio, ariltio, tiocarbossilato, solfati, alchilsolfinile, solfonato, solfamoile, solfonamido, nitro, trifluorometile, ciano, azido, eterociclice, alchilarile, o una porzione aromatica o eteroaromatica.

Il termine "tiocarbonile" o "tiocarbosi" include composti e porzioni che contengono porzioni che contengono un carbonio connesso con un doppio legame a un atomo di zolfo.

Il termine "tioetere" include porzioni che contengono un atomo di zolfo legato a due atomi di carbonio o a eteroatomi. Esempi di tioeteri includono, ma non sono limitati a alctioalchili, alctioalchenili, e alctioalchinili. Il termine "alctioalchili" include porzioni con un gruppo alchilico, alchenilico, o alchinilico legato a un atomo di zolfo che è legato a un gruppo alchilico. In maniera simile, il termine "alctioalchenili" si riferisce a porzioni in cui un gruppo alchilico, alchenilico, o alchinilico è legato a un atomo di zolfo che è legato in maniera covalente a un gruppo alchenilico; e alctioalchinili" si riferisce a porzioni in cui un gruppo alchilico, alchenilico, o alchinilico è legato a un atomo di zolfo che è legato in maniera covalente a un gruppo alchinilico.

Come usato qui, "ammina" o "ammino" si riferisce a  $-NH_2$  non sostituito o sostituito. "Alchilammino" include gruppi di composti in cui l'azoto di  $-NH_2$  è legato ad almeno un gruppo alchilico. Esempi di gruppi alchilammino includono benzilammino, metilammino, etilammino, fenetilammino, ecc. "Dialchilammino" include gruppi in cui l'azoto di  $-NH_2$  è legato ad almeno due gruppo alchilici aggiuntivi. Esempi di gruppi dialchilammino includono, ma non sono limitati a, dimetilammino e dietilammino. "Arilammino" e "diarilammino" includono gruppi in cui l'azoto è legato ad almeno uno o due gruppi arilici, rispettivamente. "Amminoarile" e "amminoarilossi" si riferiscono ad arile e arilossi sostituiti con ammino. "Alchilarilammino," "alchilamminoarile" o "arilamminoalchile" si riferisce a un gruppo amminico che è legato ad almeno un gruppo alchilico e ad almeno un gruppo arilico. "Alcamminoalchile" si riferisce a un gruppo alchilico, alchenilico, o alchinilico legato a un atomo di azoto

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPI 090

che è anche legato a un gruppo alchilico. "Acilammino" include gruppi in cui l'azoto è legato a un gruppo acile. Esempi di acilammino includono, ma non sono limitati a, gruppi alchilcarbonilammino, arilcarbonilammino, carbamoile e ureido.


Il termine "amide" o "amminocarbossi" include composti o porzioni che contengono un atomo di azoto che è legato al carbonio di un gruppo carbonilico o uno tiocarbonilico. Il termine include gruppi "alcamminocarbossi" che includono gruppi alchilici, alchenilici, o alchinilici legati a un gruppo amminico che è legato al carbonio di un gruppo carbonilico o uno tiocarbonilico. Include anche gruppi "arilamminocarbossi" che includono porzioni ariliche o eteroariliche legate a un gruppo amminico che è legato al carbonio di un gruppo carbonilico o uno tiocarbonilico. I termini "alchilamminocarbossi", "alchenilamminocarbossi", "alchinilamminocarbossi" e "arilamminocarbossi" includono porzioni in cui porzioni alchiliche, alcheniliche, alchiniliche e ariliche, rispettivamente, sono legate a un atomo di azoto che è a sua volta legato al carbonio di un gruppo carbonilico. Le amidi possono essere sostituite con sostituenti come alchile a catena lineare, alchile ramificato, cicloalchile, arile, eteroarile o eterociclo. I sostituenti sui gruppi amidici possono essere inoltre sostituiti.

Nella presente descrizione dettagliata, la formula di struttura del composto rappresenta un certo isomero per comodità in alcuni casi, ma la presente descrizione illustrativa include tutti gli isomeri, come gli isomeri geometrici, gli isomeri ottici basati su un carbonio asimmetrico, gli stereoisomeri, i tautomeri, e simili, essendo inteso che non tutti gli isomeri possono avere il medesimo livello di attività. In aggiunta, un polimorfismo cristallino può essere presente per i composti rappresentati dalla formula. E' noto che qualsiasi forma cristallina, miscela di forme cristalline, o sua anidride o idrato è incluso nell'ambito della presente invenzione. Inoltre, il cosiddetto metabolita che è prodotto per degradazione del presente composto *in vivo* è incluso nell'ambito della presente invenzione.

"Isomeria" significa composti che hanno identiche formule molecolari ma differiscono nella sequenza di legame dei loro atomi o nella disposizione dei loro atomi nello spazio. Gli isomeri che differiscono nella disposizione dei loro atomi nello spazio sono chiamati "stereoisomeri". Gli stereoisomeri che non sono immagini speculari uno dell'altro sono chiamati "diastereoisomeri", e gli stereoisomeri che sono immagini speculari non sovrapponibili uno dell'altro sono chiamati "enantiomeri" o a volte isomeri ottici. Una miscela contenente uguali quantità di forme enantiomeriche individuali di chiralità opposta è chiamata una "miscela racemica".

Un atomo di carbonio legato a quattro sostituenti non identici è chiamato un "centro chirale".

"Isomero chirale" significa un composto con almeno un centro chirale. Composti con più di un centro chirale possono esistere o come diastereomeri individuali o come una miscela di diastereomeri, chiamata "miscela diastereomerica". Quando è presente un centro chirale, uno stereoisomero può essere caratterizzato dalla configurazione assoluta (R o S) di quel centro chirale. La configurazione assoluta si riferisce alla

  
Marco Giovanni Mari  
USPTO SPI-090

disposizione nello spazio dei sostituenti attaccati al centro chirale. I sostituenti attaccati al centro chirale in considerazione sono classificati in conformità con la *Sequence Rule* di Cahn, Ingold and Prelog. (Cahn et al., *Angew. Chem. Inter. Edit.* 1966, 5, 385; errata 511; Cahn et al., *Angew. Chem.* 1966, 78, 413; Cahn and Ingold, *J. Chem. Soc.* 1951 (London), 612; Cahn et al., *Experientia* 1956, 12, 81; Cahn, *J. Chem. Educ.* 1964, 41, 116).

“Isomero geometrico” significa i diastereomeri che devono la loro esistenza alla rotazione ostacolata intorno a doppi legami o un linker cicloalchilico (per es., 1,3-ciclobutile). Queste configurazioni sono differenziate nei loro nomi dai prefissi cis e trans, o Z ed E, che indicano che i gruppi sono sul medesimo o sull’opposto lato del doppio legame nella molecola secondo le regole Cahn-Ingold-Prelog.

Si deve capire che i composti descritti qui possono essere raffigurati come differenti isomeri chirali o isomeri geometrici. Si dovrebbe anche capire che quando i composti hanno forme isomeriche chirali o isomeriche geometriche, tutte le forme isomeriche è inteso che siano incluse nell’ambito della presente invenzione, e la denominazione dei composti non esclude alcuna forma isomerica, essendo inteso che non tutti gli isomeri possono avere il medesimo livello di attività.

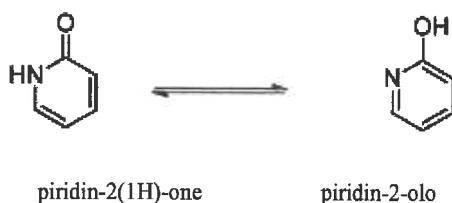
Inoltre, le strutture e altri composti discussi in questa invenzione includono tutti i loro isomeri atropici, essendo inteso che non tutti gli isomeri atropici possono avere il medesimo livello di attività. Gli “isomeri atropici” sono un tipo di stereoisomeri in cui gli atomi di due isomeri sono disposti in maniera differente nello spazio. Gli isomeri atropici devono la loro esistenza a una rotazione limitata causata dall’impedimento alla rotazione di grandi gruppi intorno a un legame centrale. Tali isomeri atropici esistono tipicamente come una miscela, tuttavia come risultato di recenti avanzamenti nelle tecniche cromatografiche, è stato possibile separare miscele di due isomeri atropici in casi selezionati.

“Tautomero” è uno di due o più isomeri strutturali che esistono in equilibrio ed è prontamente convertito da una forma isomerica a un’altra. Questa conversione risulta nella migrazione formale di un atomo di idrogeno accompagnata da uno scambio di doppi legami coniugati adiacenti. I tautomeri esistono come una miscela di un insieme tautomerico in soluzione. Nelle soluzioni in cui la tautomerizzazione è possibile, sarà raggiunto un equilibrio chimico dei tautomeri. Il rapporto esatto dei tautomeri dipende da parecchi fattori, inclusi temperatura, solvente e pH. Il concetto di tautomeri che sono interconvertibili mediante tautomerizzazioni è chiamato tautomeria.

Dei vari tipi di tautomeria che sono possibili, due si osservano comunemente. Nel tautomeria cheto-enolico si verifica uno spostamento simultaneo di elettroni e di un atomo di idrogeno. La tautomeria catena ad anello origina come risultato del gruppo aldeidico (-CHO) in una molecola a catena di zucchero che reagisce con uno dei gruppi idrossi (-OH) nella medesima molecola per darle una forma ciclica (a forma di anello) come esibito dal glucosio.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Le coppie tautomeriche comune sono: tautomeria chetone-enolo, amide-nitrile, lattame-lattime, amide-acido imidico negli anelli eterociclici (per es., nelle basi nucleotidiche come guanina, timina e citosina), imina-enammina e enammina-enammina. Un esempio di equilibrio cheto-enolico è tra piridin-2(1H)-oni e i corrispondenti piridin-2-oli, come mostrato sotto.



Si deve capire che i composti descritti qui possono essere raffigurati come differenti tautomeri. Si dovrebbe anche capire che quando i composti hanno forme tautomeriche, tutte le forme tautomeriche si intende che siano incluse nell'ambito della presente invenzione, e la denominazione dei composti non esclude alcuna forma tautomerica. Sarà inteso che certi tautomeri possono avere un livello più alto di attività di altri.

Il termine "polimorfi cristallini", "polimorfi" o "forme cristalline" significa strutture cristalline in cui un composto (o un suo sale o solvato) può cristallizzare in differenti disposizioni di impaccamento dei cristalli, tutti i quali hanno la medesima composizione elementare. Differenti forme cristalline solitamente hanno differenti schemi di diffrazione ai raggi X, spettro infrarosso, punti di fusione, durezza di densità, forma cristallina, proprietà ottiche ed elettriche, stabilità e solubilità. Il solvente di ricristallizzazione, la velocità di cristallizzazione, la temperatura di immagazzinamento, e altri fattori possono portare una forma cristallina a dominare. I polimorfi cristallini dei composti possono essere preparati mediante cristallizzazione in condizioni differenti.

I composti di ognuna delle Formule descritte qui includono i composti stessi, come pure i loro sali o i loro solvati, se applicabile. Un sale, per esempio, si può formare tra un anione e un gruppo carico positivamente (per es., ammino) su un composto di benzene aril- o eteroaril-sostituito. Anioni opportuni includono cloruro, bromuro, ioduro, solfato, bisolfato, solfamato, nitrato, fosfato, citrato, metanosolfonato, trifluoroacetato, glutammato, glucuronato, glutarato, malato, maleato, succinato, fumarato, tartrato, tosilato, salicilato, lattato, naftalenesolfonato, e acetato (per es., trifluoroacetato). Il termine "anione farmaceuticamente accettabile" si riferisce a un anione opportuno per formare un sale farmaceuticamente accettabile. Parimenti, un sale può anche formarsi tra un catione e un gruppo carico negativamente (per es., carbossilato) su un composto di benzene aril- o eteroaril-sostituito. Cationi opportuni includono ione sodio, ione potassio, ione magnesio, ione calcio, e un catione ammonio come lo ione tetrametilammonio. I composti di benzene aril- o eteroaril-sostituito includono anche quei sali contenenti atomi di azoto quaternario.

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

In aggiunta, i composti descritti qui, per esempio, i sali dei composti, possono esistere in forma o idrata o non idrata (la anidra) o come solvati con altre molecole di solvente. Esempi non limitanti di idrati includono monoidrati, diidrati, ecc. Esempi non limitanti di solvati includono etanolo solvati, acetone solvati, ecc.

“Solvato” significa forme con addizione di solvente che contengono quantità stechiometriche o non stechiometriche di solvente. Alcuni composti hanno la tendenza a intrappolare un rapporto molare fisso di molecole di solvente nello stato solido cristallino, formando così un solvato. Se il solvente è acqua il solvato formato è un idrato; e se il solvente è alcool, il solvato formato è un alcolato. Gli idrati sono formati dalla combinazione di una o più molecole di acqua con una molecola della sostanza in cui l’acqua mantiene il suo stato molecolare come H<sub>2</sub>O.

Come usato qui, il termine “analogo” si riferisce a un composto chimico che è strutturalmente simile a un altro ma differisce leggermente nella composizione (come nel rimpiazzo di un atomo mediante un atomo di un elemento differente o in presenza di un particolare gruppo funzionale, o il rimpiazzo di un gruppo funzionale mediante un altro gruppo funzionale). Pertanto, un analogo è un composto che è simile o confrontabile in funzione e apparenza, ma non in struttura o origine al composto di riferimento.

Come definito qui, il termine “derivato” si riferisce a composti che hanno una struttura centrale comune, e sono sostituiti con vari gruppi come descritto qui. Per esempio, tutti i composti rappresentati dalla Formula (I) sono composti di benzene aril- o eteroaril-sostituito, e hanno la Formula (I) come nucleo comune.

Il termine “bioisostero” si riferisce a un composto risultante dallo scambio di un atomo o di un gruppo di atomi con un altro, ampiamente simile, atomo o gruppo di atomi. L’obiettivo di una sostituzione bioisosterică è creare un nuovo composto con proprietà biologiche simili al composto d’origine. La sostituzione bioisosterică può essere su base fisicochimica o topologica. Esempi di bioisosteri di acidi carbossilici includono, ma non sono limitati a, acil solfonimidi, tetrazoli, solfonati e fosfonati. Vedere, per es., Patani and LaVoie, Chem. Rev. 96, 3147-3176, 1996.

La presente descrizione illustrativa si intende che includa tutti gli isotopi degli atomi che si trovano nei presenti composti. Gli isotopi includono queglii atomi aventi il medesimo numero atomico ma differenti numeri di massa. A titolo di esempio generale e senza limitazione, gli isotopi dell’idrogeno includono tritio e deuterio, e gli isotopi del carbonio includono C-13 e C-14.

Sono qui descritti procedimenti per la sintesi dei composti di qualsiasi Formula descritta qui. Sono anche descritti qui procedimenti dettagliati per la sintesi di vari composti descritti secondo i seguenti schemi come mostrato negli Esempi.

In tutta la descrizione, dove le composizioni sono descritte in quanto aventi, includenti, o comprendenti componenti specifici, è

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

contemplato che le composizioni consistano anche essenzialmente di, o consistano di, i componenti elencati. In maniera simile, dove i procedimenti o i processi sono descritti in quanto aventi, includenti, o comprendenti passaggi specifici del processo, i processi consistano anche essenzialmente di, o consistano di, i passaggi di lavorazione elencati. Inoltre, si dovrebbe capire che l'ordine dei passaggi o l'ordine di esecuzione di certe azioni è immateriale fintanto che l'invenzione rimane fattibile. Inoltre, due o più passaggi o azioni possono essere condotti simultaneamente.

I processi di sintesi descritti qui possono tollerare un'ampia varietà di gruppi funzionali, perciò si possono usare vari materiali di partenza sostituiti. I processi generalmente forniscono il composto finale desiderato al termine o quasi del processo complessivo, sebbene possa essere desiderabile in certi casi convertire ulteriormente il composto in un suo sale, polimorfo o solvato farmaceuticamente accettabile.

I composti descritti qui possono essere preparati in una varietà di modi usando materiali di partenza disponibili commercialmente, composti noti nella letteratura, o da intermedi prontamente preparati, impiegando procedimenti e procedure di sintesi standard o noti a quelli esperti nella tecnica, o che saranno evidenti all'operatore esperto alla luce degli insegnamenti qui riportati. I procedimenti e le procedure di sintesi standard per la preparazione di molecole organiche e trasformazioni e manipolazioni di gruppi funzionali possono essere ottenuti dalla letteratura scientifica rilevante o da manuali standard nel campo. Sebbene non limitati ad una o parecchie fonti, testi classici come Smith, M. B., March, J., March's *Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 5a edizione, John Wiley & Sons: New York, 2001; Greene, T.W., Wuts, P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3a edizione, John Wiley & Sons: New York, 1999; R. Larock, *Comprehensive Organic Transformations*, VCH Publishers (1989); L. Fieser and M. Fieser, *Fieser and Fieser's Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1994); e L. Paquette, ed., *Encyclopedia of Reagents for Organic Synthesis*, John Wiley and Sons (1995), sono manuali di sintesi organica utili e riconosciuti di riferimento noti a quelli nella tecnica. Le seguenti descrizioni di procedimenti di sintesi sono progettate per illustrare, ma non limitare, le procedure generali per la preparazione di composti descritte qui.

I composti descritti qui possono essere comodamente preparati mediante una varietà di procedimenti familiari a quelli esperti nella tecnica. I composti descritti qui con qualsiasi Formula descritta qui possono essere preparati secondo le procedure illustrate negli Schemi 1-10 riportati sotto, da materiali di partenza disponibili commercialmente o da materiali di partenza che possono essere preparati usando procedure in letteratura. I gruppi Z e R (come R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub>, R<sub>4</sub>, R<sub>6</sub>, R<sub>7</sub>, R<sub>8</sub>, e R<sub>12</sub>) negli Schemi 1-10 sono come definito in qualsiasi delle Formule descritte qui, se non altrimenti specificato.

Uno di normale abilità nella tecnica noterà che, durante le sequenze di reazione e gli schemi di sintesi descritti qui, l'ordine di certi passaggi può essere cambiato, come l'introduzione e la rimozione di gruppi di protezione.

Marco Giovanni Mari  
USBM • CPI-090

Uno di normale abilità nella tecnica riconoscerà che certi gruppi possono richiedere protezione dalle condizioni di reazione tramite l'uso di gruppi di protezione. I gruppi di protezione possono anche essere usati per differenziare gruppi funzionali simili nelle molecole. Un elenco dei gruppi di protezione e come introdurre e rimuovere questi gruppi si può trovare in Greene, T.W., Wuts, P.G. M., *Protective Groups in Organic Synthesis*, 3a edizione, John Wiley & Sons: New York, 1999.

I gruppi di protezione preferiti includono, ma non sono limitati a:

Per una porzione idrossile: TBS, benzile, THP, Ac

Per acidi carbossilici: benzil estere, metil estere, etil estere, allil estere

Per ammine: Cbz, BOC, DMB

Per dioli: Ac (x2) TBS (x2), o quando presi insieme acetoni

Per tioli: Ac

Per benzimidazoli: SEM, benzile, PMB, DMB

Per aldeidi: di-alchil acetali come dimetossi acetale o dietil acetile.

Negli schemi di reazione descritti qui, possono essere prodotti molteplici stereoisomeri. Quando non è indicato un particolare stereoisomero, si capisce che significa tutti i possibili stereoisomeri che potrebbero essere prodotti dalla reazione. Una persona di normale abilità nella tecnica riconoscerà che le reazioni possono essere ottimizzate per dare un isomero preferenzialmente, o nuovi schemi possono essere ideati per produrre un singolo isomero. Se sono prodotte miscele, tecniche come cromatografia preparativa su strato sottile, HPLC preparativa, HPLC chirale preparativa, o SFC preparativa possono essere usate per separare gli isomeri.

Le seguenti abbreviazioni sono usate in tutta la descrizione dettagliata e sono definite sotto:

Ac	acetile
AcOH	acido acetico
aq.	acquoso
BID o b.i.d.	bis in die (due volte al giorno)
BOC	tert-butossi carbonile
Cbz	benzilossi carbonile
CDCl <sub>3</sub>	cloroformio deuterato

Marco Giovanni Mari  
USEM-CPI-090

CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diclorometano
DCM	diclorometano
DMB	2,4 dimetossi benzile
DMF	N,N-Dimetilformammide
DMSO	Dimetil solfosside
EA o EtOAc	Etil acetato
EDC o EDCI	N-(3-Dimetilamminopropil)-N'-etilcarbodiimide
ESI-	Elettrospray modalità negativa
ESI+	Elettrospray modalità positiva
EtOH	etanolo
h	ore
H <sub>2</sub> O	acqua
HOBt	1-idrossibenzotriazolo
HCl	cloruro di idrogeno o acido cloridrico
HPLC	Cromatografia liquida ad alte prestazioni
K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	potassio carbonato
LC/MS o LC-MS	Cromatografia liquida spettrometria di massa
M	Molare
MeCN	Acetonitrile
min	minuti
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	sodio carbonato
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sodio solfato
NaHCO <sub>3</sub>	sodio bicarbonato
NaHMDs	Sodio esametildisilazide
NaOH	sodio idrossido

Marco Giovanni Mari  
 USBM - CPI-090

NaHCO <sub>3</sub>	sodio bicarbonato
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	sodio solfato
NMR	Risonanza Magnetica nucleare
Pd(OH) <sub>2</sub>	Palladio diidrossido
PMB	para metossibenzile
p.o.	per os (somministrazione orale)
ppm	parti per milione
prep HPLC	Cromatografia liquida a alte prestazioni preparativa
PYBOP	(Benzotriazol-1-ilossi) tripirrolidinofosfonio esafluoro fosfato
Rt o RT	Temperatura ambiente
TBME	<i>tert</i> -Butil metil etere
TFA	acido trifluoroacetico
THF	tetraidrofurano
THP	tetraidropirano

Sono qui descritte composizioni farmaceutiche comprendenti un composto di qualsiasi Formula descritta qui in combinazione con almeno un eccipiente o veicolante farmaceuticamente accettabile.

Una "composizione farmaceutica" è una formulazione contenente i composti della presente invenzione in una forma adatta per la somministrazione a un soggetto. In una forma di attuazione, la composizione farmaceutica è in forma sfusa o a dosaggio unitario. La forma a dosaggio unitario è qualsiasi di una varietà di forme, incluse, per esempio, una capsula, una sacca IV, una compressa, una pompa singola su un inalatore per aerosol o una fiala. La quantità di ingrediente attivo (per es., una formulazione del composto descritto o un suo sale, idrato, solvato o isomero) in una dose unitaria della composizione è una quantità efficace e varia a seconda del particolare trattamento coinvolto. Uno esperto nella tecnica apprezzerà che è a volte necessario effettuare variazioni di routine al dosaggio a seconda dell'età e delle condizioni del paziente. Il dosaggio dipenderà anche dalla via di somministrazione. Sono contemplate una varietà di vie, inclusa orale, polmonare, rettale, parenterale, transdermica, sottocutanea, endovenosa, intramuscolare, intraperitoneale, inalativa, buccale, sottolinguale, intrapleurica, intratecale, intranasale, e simili. Le forme di dosaggio per la somministrazione topica o transdermica di un composto di questa invenzione includono polveri, spray, unguenti, paste, creme,

Marco Giovanni Mari  
 USBM - CPI-090

lozioni, gel, soluzioni, cerotti e inalanti. In una forma di attuazione, il composto attivo è mescolato in condizioni sterili con un veicolante farmaceuticamente accettabile, e con qualsiasi conservante, tampone, o propellente che sia richiesto.

Come usato qui, la frase “farmaceuticamente accettabile” si riferisce a quei composti, anioni, cationi, materiali, composizioni, veicolanti, e/o forme di dosaggio che sono, entro l’ambito del buon giudizio medico, adatti per l’uso a contatto con i tessuti di esseri umani e animali senza eccessiva tossicità, irritazione, risposta allergica, o altri problemi o complicazioni, commisurato a un ragionevole rapporto rischi/benefici.

“Eccipiente farmaceuticamente accettabile” significa un eccipiente che è utile per preparare una composizione farmaceutica che è generalmente sicura, non tossica e né biologicamente né altrimenti indesiderabile, e include un eccipiente che sia accettabile per uso veterinario come pure per uso farmaceutico umano. Un “eccipiente farmaceuticamente accettabile” come usato nella descrizione dettagliata e nelle rivendicazioni include sia uno sia più di uno di tale eccipiente.

Una composizione farmaceutica descritta qui è formulata per essere compatibile con la sua via di somministrazione prevista. Esempi di vie di somministrazione includono somministrazione parenterale, per es., endovenosa, intradermica, sottocutanea, orale (per es., inalazione), transdermica (topica), e transmucosale. Soluzioni e sospensioni usate per l’applicazione parenterale, intradermica, o sottocutanea possono includere i seguenti componenti: un diluente sterile come acqua per iniezione, soluzione salina, oli fissati, glicoli polietilenici, glicerina, glicole propilenico o altri solventi sintetici; agenti antibatterici come benzil alcool o metil paraben; antiossidanti come acido ascorbico o sodio bisolfito; agenti chelanti come acido etilenediamminotetraacetico; tamponi come acetati, citrati o fosfati, e agenti per la regolazione della tonicità come sodio cloruro o destrosio. Il pH può essere regolato con acidi o basi, come acido cloridrico o sodio idrossido. La preparazione parenterale può essere inclusa in ampolle, siringhe usa e getta o fiale a dosaggio multiplo di vetro o di plastica.

Un composto o una composizione farmaceutica descritto qui può essere somministrato a un soggetto in molti dei procedimenti ben noti attualmente usati per il trattamento chemioterapeutico. Per esempio, per il trattamento di cancro, un composto dell’invenzione può essere iniettato direttamente nei tumori, iniettato nel circolo sanguigno o in cavità corporee o assunto oralmente o applicato attraverso la pelle con cerotti. La dose scelta dovrebbe essere sufficiente a costituire un trattamento efficace ma non così alta da causare inaccettabili effetti collaterali. Lo stato della condizione patologica (per es., cancro, pre-cancro, e simile) e la salute del paziente dovrebbero essere preferibilmente monitorati strettamente durante e per un ragionevole periodo di tempo dopo il trattamento.

Il termine “quantità terapeuticamente efficace”, come usato qui, si riferisce a una quantità di un agente farmaceutico per trattare, migliorare, o prevenire una patologia o condizione identificata, o per esibire un effetto terapeutico o inibitorio rivelabile. L’effetto può essere

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPL-090

rivelato mediante qualsiasi procedimento di saggio noto nella tecnica. La quantità efficace precisa per un soggetto dipenderà dal peso corporeo, dalla dimensione, e dalla salute del soggetto; dalla natura e dal grado della condizione; e dall'agente terapeutico o dalla combinazione di agenti terapeutici scelto per la somministrazione. Quantità terapeuticamente efficaci per una data situazione possono essere determinate mediante sperimentazione di routine che è nell'abilità e nel giudizio del medico. In un aspetto preferito, la patologia o condizione da trattare è un cancro. In un altro aspetto, la patologia o condizione da trattare è un disturbo proliferativo cellulare.

Per qualsiasi composto, la quantità terapeuticamente efficace può essere stimata inizialmente o in saggi di colture cellulari, per es., di cellule neoplastiche, o in modelli animali, solitamente ratti, topi, conigli, cani, o maiali. Il modello animale può anche essere usato per determinare l'appropriato campo di variazione della concentrazione e la via di somministrazione. Tali informazioni possono quindi essere usate per determinare dosi utili e vie per la somministrazione in esseri umani. L'efficacia terapeutica/profilattica e la tossicità possono essere determinate mediante procedure farmaceutiche standard in colture cellulari o animali da esperimento, per es., ED<sub>50</sub> (la dose terapeuticamente efficace nel 50% della popolazione) e LD<sub>50</sub> (la dose letale per il 50% della popolazione). Il rapporto delle dosi tra effetti tossici e terapeutici è l'indice terapeutico, e può essere espresso come il rapporto, LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub>. Si preferiscono le composizioni farmaceutiche che esibiscono grandi indici terapeutici. Il dosaggio può variare entro questo campo di variazione a seconda della forma di dosaggio impiegata, della sensibilità del paziente, e della via di somministrazione.

Il dosaggio e la somministrazione sono regolati per fornire livelli sufficienti dell'(degli)agente(i) attivo(i) o per mantenere l'effetto desiderato. I fattori di cui si può tenere conto includono la gravità dello stato morbosso, la salute generale del soggetto, età, peso, e genere del soggetto, dieta, tempo e frequenza di somministrazione, combinazione(i) di farmaci, sensibilità alle reazioni, e tolleranza/risposta alla terapia. Le composizioni farmaceutiche a lunga azione possono essere somministrate ogni 3 a 4 giorni, ogni settimana, o una volta ogni due settimane a seconda dell'emivita e del tasso di clearance della particolare formulazione.

Le composizioni farmaceutiche contenenti composti attivi della presente invenzione possono essere prodotte in una maniera che è generalmente nota, per es., per mezzo di processi convenzionali di miscelazione, discioglimento, granulazione, produzione di confetti, levigazione, emulsione, incapsulamento, intrappolamento, o liofilizzazione. Le composizioni farmaceutiche possono essere formulate in una maniera convenzionale usando uno o più veicolanti farmaceuticamente accettabili comprendenti eccipienti e/o ausiliari che facilitano l'elaborazione dei composti attivi nelle preparazioni che possono essere usate farmaceuticamente. Certamente, la formulazione appropriata dipende dalla via di somministrazione scelta.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Le formulazioni farmaceutiche adatte per l'uso iniettabile includono soluzioni acquose sterili (dove idro solubili) o dispersioni e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni o dispersioni iniettabili sterili. Per la somministrazione endovenosa, veicolanti adatti includono soluzione salina fisiologica, acqua batteriostatica, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o tampone salino fosfato (PBS). In tutti i casi, la composizione deve essere sterile e deve essere fluida nella misura che permetta una facile siringabilità. Deve essere stabile nelle condizioni di produzione e immagazzinamento e deve essere conservata contro l'azione contaminante di microrganismi come batteri e funghi. Il veicolante può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, poliolo (per esempio, glicerolo, glicole propilenico, e glicole polietilenico liquido, e simili), e loro miscele opportune. L'appropriata fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento come lecitina, mediante il mantenimento della dimensione delle particelle richiesta nel caso di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. La prevenzione dell'azione di microrganismi può essere ottenuta mediante vari agenti antibatterici e antifungini, per esempio, parabeni, clorobutanolo, fenolo, acido ascorbico, timerosal, e simili. In molti casi, sarà preferibile includere agenti isotonici, per esempio, zuccheri, polialcoli come mannitolo e sorbitolo, e cloruro di sodio nella composizione. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere realizzato includendo nella composizione un agente che ritarda l'assorbimento, per esempio, alluminio monostearato e gelatina.

Le soluzioni iniettabili sterili possono essere preparate incorporando il composto attivo nella quantità richiesta in un solvente appropriato con uno o una combinazione di ingredienti enumerati sopra, come richiesto, seguito da sterilizzazione per filtrazione. In generale, le dispersioni sono preparate incorporando il composto attivo in un veicolo sterile che contiene un mezzo di dispersione di base e gli altri ingredienti richiesti da quelli enumerati sopra. Nel caso di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i procedimenti di preparazione sono essiccazione sotto vuoto e liofilizzazione che produce una polvere dell'ingrediente attivo più qualsiasi ingrediente desiderato aggiuntivo da una sua soluzione precedentemente sterilizzata per filtrazione.

Le composizioni orali includono generalmente un diluente inerte o un veicolante edibile farmaceuticamente accettabile. Esse possono essere incluse in capsule di gelatina o compresse in compresse. Per lo scopo della somministrazione terapeutica orale, il composto attivo può essere incorporato con eccipienti e usato in forma di compresse, pastiglie, o capsule. Le composizioni orali possono anche essere preparate usando un veicolante fluido per l'uso come sciacquo buccale, in cui il composto nel veicolante fluido è applicato oralmente e sibilato ed espettorato o ingoiato. Agenti di legame farmaceuticamente compatibili, e/o materiali adiuvanti possono essere inclusi come parte della composizione. Le compresse, pillole, capsule, pastiglie e simili possono contenere qualsiasi dei seguenti ingredienti, o composti di una natura simile: un legante come cellulosa microcristallina, gomma adragante o gelatina; un eccipiente come amido o lattosio, un agente disintegrante come acido alginico, Primogel, o amido

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPL-090

di mais; un lubrificante come magnesio stearato o Sterotes; un agente di scorrimento come diossido di silicio colloidale; un agente dolcificante come saccarosio o saccarina; o un agente aromatizzante come menta piperita, metil salicilato, o aroma arancia.

Per la somministrazione mediante inalazione, i composti sono consegnati nella forma di uno spray per aerosol da contenitori o distributori pressurizzati, che contengono un propellente opportuno, per es., un gas come diossido di carbonio, o un nebulizzatore.

La somministrazione sistemica può anche essere mediante mezzi transmucosali o transdermici. Per la somministrazione transmucosale o transdermica, appropriati agenti di penetrazione della barriera da permeare sono usati nella formulazione. Tali agenti di penetrazione sono generalmente noti nella tecnica, e includono, per esempio, per la somministrazione transmucosale, detergenti, sali biliari, e derivati dell'acido fusidico. La somministrazione transmucosale può essere effettuata tramite l'uso di spray nasali o di supposte. Per la somministrazione transdermica, i composti attivi sono formulati in unguenti, pomate, gel, o creme come generalmente noto nella tecnica.

I composti attivi possono essere preparati con veicolanti farmaceuticamente accettabili che proteggeranno il composto contro la rapida eliminazione dal sangue, come formulazioni a rilascio controllato, inclusi impianti e sistemi di consegna microincapsulati. Possono essere usati polimeri biodegradabili, biocompatibili, come etilene vinil acetato, polianidridi, acido poliglicolico, collagene, poliortoesteri, e acido polilattico. I procedimenti per la preparazione di tali formulazioni saranno evidenti a quelli esperti nella tecnica. I materiali possono anche essere ottenuti commercialmente da Alza Corporation e Nova Pharmaceuticals, Inc. Sospensioni liposomiali (inclusi liposomi mirati a cellule infette con anticorpi monoclonali verso antigeni virali) possono anche essere usate come veicolanti farmaceuticamente accettabili. Queste possono essere preparate secondo i procedimenti noti a quelli esperti nella tecnica, per esempio, come descritto nel Brevetto U.S. N.4,522,811.

E' soprattutto vantaggioso formulare composizioni orali o parenterali in forme di unità di dosaggio per la facilità di somministrazione e l'uniformità di dosaggio. La forma di unità di dosaggio come usato qui si riferisce a unità fisicamente discrete adatte come dosaggi unitari per il soggetto da trattare; ogni unità contenente una quantità predeterminata di composto attivo calcolata per produrre l'effetto terapeutico desiderato in associazione con il veicolante farmaceutico richiesto. La descrizione dettagliata per le forme di unità di dosaggio dell'invenzione sono dettati da e direttamente dipendenti dalle caratteristiche uniche del composto attivo e dal particolare effetto terapeutico da ottenere.

In applicazioni terapeutiche, i dosaggi delle composizioni farmaceutiche usate in conformità con l'invenzione variano a seconda dell'agente, l'età, il peso, e la condizione clinica del paziente ricevente, e l'esperienza e il giudizio del medico o del dottore che somministra la terapia, tra gli altri fattori che influenzano il dosaggio selezionato. In generale, la dose dovrebbe essere sufficiente per riuscire a rallentare, e preferibilmente a far regredire, la crescita dei tumori e anche preferibilmente a causare la completa regressione del cancro. I dosaggi possono

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

spaziare da circa 0.01 mg/kg al giorno a circa 5000 mg/kg al giorno. In aspetti preferiti, i dosaggi possono spaziare da circa 1 mg/kg al giorno a circa 1000 mg/kg al giorno. In un aspetto, la dose sarà nel campo di variazione di circa 0.1 mg/giorno a circa 50 g/giorno; circa 0.1 mg/giorno a circa 25 g/giorno; circa 0.1 mg/giorno a circa 10 g/giorno; circa 0.1 mg a circa 3 g/giorno; o circa 0.1 mg a circa 1 g/giorno, in dosi singole, divise, o continue (la quale dose può essere regolata per il peso in kg del paziente, l'area in m<sup>2</sup> della superficie corporea, e l'età in anni). Una quantità efficace di un agente farmaceutico è quella che fornisce un miglioramento oggettivamente identificabile come notato dal medico o da altro osservatore qualificato. Per esempio, la regressione di un tumore in un paziente può essere misurata con riferimento al diametro di un tumore. La diminuzione nel diametro di un tumore indica regressione. La regressione è anche indicata dall'incapacità del tumore a ripresentarsi dopo che il trattamento è terminato. Come usato qui, il termine "maniera efficace di dosaggio" si riferisce a una quantità di un composto attivo per produrre l'effetto biologico desiderato in un soggetto o cellula.

Le composizioni farmaceutiche possono essere incluse in un contenitore, pacchetto, o distributore insieme alle istruzioni per la somministrazione.

I composti descritti qui sono in grado di formare inoltre sali. Tutte queste forme sono anche contemplate nell'ambito dell'invenzione rivendicata.

Come usato qui, "sali farmaceuticamente accettabili" si riferiscono a derivati dei composti descritti qui in cui il composto d'origine è modificato realizzando i suoi sali acidi o basici. Esempi di sali farmaceuticamente accettabili includono, ma non sono limitati a, sali acidi minerali o organici di residui basici come ammine, alcali o sali organici di residui acidi come acidi carbossilici, e simili. I sali farmaceuticamente accettabili includono i sali convenzionali non tossici o i sali di ammonio quaternario del composto d'origine formati, per esempio, da acidi non tossici inorganici o organici. Per esempio, tali sali convenzionali non tossici includono, ma non sono limitati a, quelli derivati da acidi inorganici e organici scelti da 2-acetossibenzoico, 2-idrossietano solfonico, acetico, ascorbico, benzene solfonico, benzoico, bicarbonico, carbonico, citrico, edetico, etano disolfonico, 1,2-etano solfonico, fumarico, glucoptonico, gluconico, glutammico, glicolico, glicolliarsanilico, esilresorcinico, idrabamico, bromidrico, cloridrico, iodidrico, idrossimaleico, idrossinaftoico, isetionico, lattico, lattobionico, lauril solfonico, maleico, malico, mandelico, metano solfonico, napsilico, nitrico, ossalico, pamoico, pantotenico, fenilacetico, fosforico, poligalatturonico, propionico, salicilico, stearico, subacetico, succinico, solfamico, solfanilico, solfurico, tannico, tartarico, toluene solfonico, e gli amminoacidi comunemente presenti, per es., glicina, alanina, fenilalanina, arginina, ecc.

Altri esempi di sali farmaceuticamente accettabili includono acido esanoico, acido ciclopentano propionico, acido piruvico, acido

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPI-090

malonico, acido 3-(4-idrossibenzoil)benzoico, acido cinnamico, acido 4-clorobenzenesolfonico, acido 2-naftalenesolfonico, acido 4-toluenesolfonico, acido camforsolfonico, acido 4-metilbicyclo-[2.2.2]-ott-2-ene-1-carbossilico, acido 3-fenilpropionico, acido trimetilacetico, acido terziario butilacetico, acido muconico, e simili. La presente invenzione racchiude anche acidi formati quando un protone acido presente nel composto d'origine è o sostituito da uno ione metallico, per es., uno ione di metallo alcalino, uno ione alcalino terroso, o uno ione di alluminio; o si coordina con una base organica come etanolammina, dietanolammina, trietanolammina, trometammina, N-metilglucammina, e simili. Nella forma salina, è inteso che il rapporto tra il composto e il catione o l'anione del sale può essere 1:1, o qualsiasi rapporto diverso da 1:1, per es., 3:1, 2:1, 1:2, o 1:3.

Si dovrebbe capire che tutti i riferimenti a sali farmaceuticamente accettabili includono forme con addizione di solvente (solvati) o forme cristalline v(polimorfi) come definito qui, del medesimo sale.

I composti descritti qui possono anche essere preparati come esteri, per esempio, esteri farmaceuticamente accettabili. Per esempio, un gruppo con funzione di acido carbossilico in un composto può essere convertito nel suo estere corrispondente, per es., un metil, etil, o altro estere. Inoltre, un gruppo alcolico in un composto può essere convertito nel suo estere corrispondente, per es., acetato, propionato o altro estere.

I composti, o i loro sali o solvati farmaceuticamente accettabili, sono somministrati per via orale, nasale, transdermica, polmonare, inalativa, buccale, sottolinguale, intraperitoneale, sottocutanea, intramuscolare, endovenosa, rettale, intrapleurica, intratecale e parenterale. In una forma di attuazione, il composto è somministrato oralmente. Uno esperto nella tecnica riconoscerà i vantaggi di certe vie di somministrazione.

Il regime di dosaggio che utilizza i composti è scelto in conformità con una varietà di fattori inclusi tipo, specie, età, peso, sesso e condizione medica del paziente; la gravità della condizione da trattare; la via di somministrazione; la funzione renale ed epatica del paziente; e il particolare composto o suo sale impiegato. Un medico o un veterinario normalmente esperto può prontamente determinare e prescrivere la quantità efficace del farmaco richiesto per prevenire, contrastare, o arrestare il progredire della condizione.

Tecniche per la formulazione e la somministrazione dei composti descritti dell'invenzione si possono trovare in Remington: the Science and Practice of Pharmacy, 19a edizione, Mack Publishing Co., Easton, PA (1995). In una forma di attuazione, i composti descritti qui, e i loro sali farmaceuticamente accettabili, sono usati in preparazioni farmaceutiche in combinazione con un veicolante o un diluente farmaceuticamente accettabile. Veicolanti farmaceuticamente accettabili adatti includono riempitivi solidi inerti o diluenti e soluzioni acquose o organiche sterili. I composti saranno presenti in tali composizioni farmaceutiche in quantità sufficienti a fornire la quantità di dosaggio desiderata nel campo di variazione descritto qui.

Tutte le percentuali e i rapporti usati qui, se non altrimenti indicato, sono in peso. Altri tratti distintivi e vantaggi della presente invenzione sono evidenti dai differenti esempi. Gli esempi forniti illustrano differenti componenti e metodologie utili nella pratica della presente invenzione. Gli esempi non limitano l'invenzione rivendicata. Sulla base della presente descrizione illustrativa l'operatore esperto può identificare e impiegare altri componenti e metodologie utili per mettere in pratica la presente invenzione.

Negli schemi di sintesi descritti qui, i composti possono essere disegnati per semplicità con una particolare configurazione. Tali particolari configurazioni non devono essere considerate come limitanti l'invenzione a uno o a un altro isomero, tautomero, regioisomero o stereoisomero, né escludono miscele di isomeri, tautomeri, regioisomeri o stereoisomeri; tuttavia, si comprenderà che un dato isomero, tautomero, regioisomero o stereoisomero può avere un livello di attività più alto di un altro isomero, tautomero, regioisomero o stereoisomero.

I composti progettati, selezionati e/o ottimizzati mediante i procedimenti descritti sopra, una volta prodotti, possono essere caratterizzati usando una varietà di saggi noti a quelli esperti nella tecnica per determinare se i composti hanno attività biologica. Per esempio, le molecole possono essere caratterizzate mediante saggi convenzionali, inclusi ma non limitati a quei saggi descritti sotto, per determinare se hanno una predetta attività, attività di legame e/o specificità di legame.

Inoltre, vagli ad alta produttività possono essere usati per velocizzare l'analisi usando tali saggi. Come risultato, può essere possibile vagliare rapidamente le molecole descritte qui per l'attività, usando tecniche note nell'arte. Metodologie generali per eseguire vagli ad alta produttività sono descritte, per esempio, Devlin (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; e Brevetto U.S. N. 5,763,263. I saggi ad alta produttività possono usare una o più differenti tecniche di saggio, incluse, ma non limitate a, quelle descritte sotto.

Un inibitore di EZH2 può, se desiderato, essere presentato in un corredo (per es., un pacchetto o in dispositivo distributore) che può contenere una o più forme per dosaggio unitario contenenti l'inibitore di EZH2. Il pacchetto può per esempio comprendere un foglio di metallo o di plastica, come un blister. Il pacchetto o il dispositivo distributore può essere accompagnato da istruzioni per la somministrazione. Le composizioni comprendenti un inibitore di EZH2 descritto qui formulate in un veicolante farmaceutico compatibile possono anche essere preparate, poste in un contenitore appropriato, ed etichettate per il trattamento di una condizione indicata. Le istruzioni per l'uso possono anche essere fornite.

Sono qui forniti anche corredi comprendenti una pluralità di reagenti per la rivelazione della metilazione che rivelano H3-K27 metilato. Per esempio, il corredo include reagenti di rivelazione di H3-K27 mono-metilato, H3-K27 di-metilato e H3-K27 tri-metilato. Il reagente di rivelazione è per esempio anticorpi o loro frammenti, polipeptidi o aptameri.

Un corredo può anche includere reagenti per rivelare la perdita di funzione di almeno un componente del complesso SWI/SNF, per es.,

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

acidi nucleici che identificano in maniera specifica una sequenza di acido nucleico del componente mutante avendo sequenze di acido nucleico omologhe, come sequenze oligonucleotidiche, complementari a una porzione della sequenza di acido nucleico del componente mutante o anticorpi verso proteine codificate dagli acidi nucleici del componente di tipo selvatico e/o mutante confezionati insieme nella forma di un corredo. Gli oligonucleotidi possono essere frammenti del gene del componente. Per esempio gli oligonucleotidi possono essere 200, 150, 100, 50, 25, 10 o meno nucleotidi in lunghezza. Il corredo può contenere in contenitori separati un aptamero o un anticorpo, formulazioni di controllo (positivo e/o negativo), e/o un'etichetta rivelabile come fluoresceina, proteina fluorescente verde, rodamina, coloranti di cianina, coloranti Alexa, luciferasi, radioetichette, tra le altre. In aggiunta, reagenti per rivelare l'attività biologica del complesso SWI/SNF (come la sua attività di rimodellazione della cromatina) possono essere inclusi nel corredo.

Istruzioni (per es., scritte, registrate, VCR, CD-ROM, ecc.) per effettuare il saggio possono essere incluse nel corredo. Il saggio può per esempio essere nella forma di un'analisi Western Blot, Immunoistochimica (IHC), immunofluorescenza (IF), sequenziamento e spettrometria di Massa (MS) come noto nella tecnica.

#### **Esempio 1: Regressione Tumorale Durevole in Linfomi e Tumori Rabboidi Maligni Geneticamente Alterati mediante Inibizione di EZH2**

**Il Composto A è un potente e selettivo inibitore di EZH2:** saggi biochimici privi di cellule che includono SAM radiomarcato e oligonucleosomi di eritrociti di pollo o peptidi corrispondenti a H3K27 come substrati hanno mostrato che il Composto A inibiva selettivamente l'attività di PRC2 umano contenente EZH2 di tipo selvatico con un valore della costante di inibizione (Ki) di  $2.5 \pm 0.5$  nmol/L e valori di IC<sub>50</sub> di  $11 \pm 5$  nM (saggio con nucleosomi) o  $16 \pm 12$  nM (saggio con peptidi). I valori di IC<sub>50</sub> erano simili per gli enzimi EZH2 umano e di ratto come pure per le proteine EZH2 che portano tutte le mutazioni note di cambio di funzione del linfoma. Il valore di IC<sub>50</sub> del Composto A aumentava con la concentrazione crescente di SAM, ma era minimamente influenzato aumentando la quantità di oligonucleosoma che è compatibile con una modalità di inibizione SAM-competitiva e nucleosoma-non competitiva. Allo scopo di dimostrare la selettività di HMT, è stata accertata l'inibizione mediante il Composto A contro un pannello di HMT diversi da EZH2 inclusi HMT sia di lisina sia di arginina. Il Composto A esibiva una selettività di 35 volte in contrapposizione a EZH1 e una selettività maggiore di 4500 volte rispetto ad altri HMT testati.

**Il Composto A inibisce in maniera specifica la metilazione di H3K27 cellulare nelle cellule:** Quando cellule di linfoma mutante WSU-DLCL2 EZH2 Y641F sono state incubate con il Composto A per 4 giorni, è stata osservata una riduzione concentrazione-dipendente nei livelli globali di H3K27Me3 con un valore medio di IC<sub>50</sub> di 0.26  $\mu$ M (livelli di H3K27Me3 determinati mediante ELISA). Quando si è studiata la cinetica dell'inibizione della metilazione, l'emivita di H3K27Me3 era approssimativamente 1 giorno poiché il 90% dell'inibizione è stata solo

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

ottenuta dopo 3 a 4 giorni di incubazione. Quando le cellule di linfoma di tipo selvatico OCI-LY19 EZH2 sono state incubate con il Composto A 2.7  $\mu\text{M}$  per 4 giorni, gli unici marchi metilici colpiti erano H3K27Me1, H3K27Me2 e H3K27Me3, i tre prodotti noti della catalisi con PRC2. L'incubazione con il Composto A è risultata anche in un aumento nell'acetilazione di H3K27. La capacità del Composto A di ridurre i livelli di trimetilazione globale di H3K27 è stata ulteriormente testata in parecchie altre linee cellulari di linfoma umano incluse linee che esprimono EZH2 di tipo selvatico o mutante. Il Composto A ha ridotto H3K27Me3 con Potenza simile in tutte le linee cellulari indipendenti dallo stato di EZH2 (Tabella 1).

**Il Composto A porta all'uccisione selettiva di linee cellulari di linfoma che portano mutazioni puntiformi di EZH2:** L'incubazione di cellule mutanti WSU-DLCL2 EZH2 Y641F con il Composto A porta a effetti anti-proliferativi con un valore medio di  $\text{IC}_{50}$  di  $0.28 \pm 0.14 \mu\text{M}$  in un saggio di proliferazione di 6 giorni. La cinetica dell'effetto del Composto A sul numero di cellule vitali è stata ulteriormente testata per un periodo esteso di tempo di 11 giorni. L'effetto anti-proliferativo del Composto A era evidente dopo che le cellule WSU-DLCL2 erano state esposte al composto per più di 4 giorni, compatibile con la cinetica dell'inibizione della metilazione di H3K27 cellulare mediata dal Composto A. Il valore di  $\text{IC}_{50}$  per l'inibizione con il Composto A della proliferazione di cellule WSU-DLCL2 nel saggio di 11 giorni ( $0.0086 \mu\text{M}$ , Tabella 1) era più basso quando confrontato ai risultati ottenuti con un saggio di proliferazione di 6 giorni, suggerendo un'umentata sensibilità con periodi di incubazione più lunghi. In contrasto con le cellule WSU-DLCL2, la crescita delle cellule di linfoma umano OCI-LY19 (EZH2 di tipo selvatico per il residuo Y641) oltre gli 11 giorni non era significativamente influenzata, nonostante valori di  $\text{IC}_{50}$  confrontabili per l'inibizione di H3K27Me3 per entrambe le linee cellulari (Tabella 1). Allo stato calcolata la più bassa concentrazione citotossica (LCC) per una particolare linea cellulare. Il valore di LCC per le cellule di linfoma umano mutante WSU-DLCL2 EZH2 Y641F era significativamente più basso quando confrontato con le cellule OCI-LY19 che sono di tipo selvatico per EZH2 (Tabella 1). Questa uccisione cellulare specifica per il contesto è stata ulteriormente sostenuta dai risultati dai saggi di proliferazione di 11 giorni con un pannello esteso di linee cellulari di linfoma. Tutte le linee cellulari ospitanti una mutazione di EZH2, con l'eccezione della linea cellulare RL (EZH2 Y641N), erano più sensibili agli effetti anti-proliferativi del Composto A quando confrontate con linee cellulari con EZH2 di tipo selvatico (Tabella 1). La linea cellulare Pfeiffer (EZH2 A677G) mostrava un aumento di 20 a 300 volte nella sensibilità al Composto A, come misurato dai valori di  $\text{IC}_{50}$  e da LCC, rispettivamente, lungo le linee cellulari mutanti Y641. In seguito è stato investigato il tempo minimo di esposizione al composto necessario per l'uccisione cellulare prolungata mediante esperimenti di rimozione. I valori di LCC il giorno 11 o 14 per le cellule WSU-DLCL2 che sono state incubate o con il Composto A per 7 giorni (seguito da 7 giorni di rimozione del composto) o in maniera continua per 14 giorni erano simili (Tabella 2). L'esposizione al farmaco per soli 4 giorni, tuttavia, non era sufficiente a

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

indurre valori di LCC simili all'incubazione continua.

**Il Composto A induce l'arresto in G<sub>1</sub> e l'apoptosi in cellule di linfoma con EZH2 mutante:** In seguito, sono stati accertati gli effetti dell'incubazione con il Composto A (1  $\mu$ M) per 7 giorni sulla progressione del ciclo cellulare e l'apoptosi in cellule WSU-DLCL2. Un aumento nella percentuale di cellule in fase G<sub>1</sub>, e una diminuzione nella percentuale di cellule in fase S e in fase G<sub>2</sub>/M era evidente dopo 2 giorni di incubazione con il Composto A. L'effetto massimo è stato ottenuto dopo 4 giorni. Non c'era un aumento evidente nella frazione sub-G<sub>1</sub> suggerendo che l'apoptosi non fosse indotta dall'incubazione con il Composto A per 7 giorni. Questo è in accordo con le curve di crescita delle cellule WSU-DLCL2 in presenza del Composto A indicando che gli effetti citotossici sono stati osservati solo dopo 7 giorni di incubazione. Successivamente all'incubazione di cellule WSU-DLCL2 con il Composto A per fino a 14 giorni, la frazione di cellule apoptotiche determinata mediante il saggio TUNEL era significativamente aumentata il giorno 14 in confronto al veicolo, indicando che la morte cellulare mediata dal Composto A si verificava tramite l'induzione di apoptosi.

**La somministrazione orale del Composto A porta all'inibizione del bersaglio EZH2 in modelli di xenotrapianto con EZH2 mutante in topi:** È stato investigato l'effetto del dosaggio orale del Composto A sull'esposizione sistemica al composto e l'inibizione del bersaglio *in vivo* nei topi che portano xenotrapianti di linfoma con EZH2 mutante. Prima, topi SCID impiantati in via sottocutanea con xenotrapianti di WSU-DLCL2 sono stati dosati per via orale con il Composto A per 4 o 7 giorni. La misurazione dei livelli plasmatici di Composto A 5 minuti prima o 3 ore dopo l'ultima dose ha rivelato un chiaro aumento dose dipendente nell'esposizione. Solo gli animali dosati a 160 mg/kg TID o 213 mg/kg BID hanno mantenuto livelli medi del composto nel plasma al di sopra di LCC per le cellule WSU-DLCL2 per tutto un ciclo di dosaggio (1652 ng/mL, con il legame a proteine plasmatiche murine considerato). La determinazione del composto in omogenati da tumori raccolti 3 ore dopo l'ultima dose ha rivelato che solo per i gruppi con dose più alta i livelli del composto nei 2 compartimenti erano simili. Quando sono stati analizzati i livelli di H3K27Me3 nei tumori, è stata osservata un'inibizione del bersaglio EZH2 dose dipendente. L'inibizione di H3K27Me3 era minore in tumori da topi dosati a 213 mg/kg QD, suggerendo che mantenere una concentrazione plasmatica al di sopra di LCC per tutto un ciclo di dosaggio è richiesto per l'inibizione ottimale del bersaglio. Dosare per 4 giorni a 160 mg/kg TID è risultato in un'inibizione del bersaglio leggermente inferiore che dosando per 7 giorni con medesima dose e programma, indicando che il dosaggio prolungato aumentava il grado di inibizione del bersaglio in tumori WSU-DLCL2. È stato eseguito uno studio simile su 7 giorni in topi nudi impiantati per via sottocutanea con xenotrapianti di KARAPS-422 accertante i programmi sia BID sia QD. Il Composto A induceva una riduzione dose-dipendente dei livelli del tumore H3K27Me3 con entrambi i regimi.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

**Il Composto A induce significativi effetti anti-tumorali in parecchi xenotrapianti di linfoma con EZH2 mutante:** Quando topi SCID portanti il tumore da xenotrapianto mutante WSU-DLCL2 EZH2 Y641F sono stati trattati con il Composto A per 28 giorni, è stata osservata un'inibizione della crescita tumorale dose-dipendente, 58% alla dose più alta di 150 mg/kg TID. Solo gli animali a cui è stata somministrata la dose più alta mantenevano livelli plasmatici medi di Composto A al di sopra di LCC per le cellule WSU-DLCL2 per tutto il ciclo di dosaggio. Il dosaggio del Composto A per 28 giorni ha portato a un accumulo relativo del composto nel tessuto tumorale in confronto al plasma, in contrasto con quanto è stato osservato con il dosaggio per 7 giorni. L'analisi ELISA degli istoni da tumori raccolti il giorno 28 indicavano l'inibizione del bersaglio dose dipendente. I livelli di H3K27Me3 in xenotrapianti WSU-DLCL2 erano più bassi nei topi dosati per 28 giorni in confronto a 7 giorni indicando che la somministrazione prolungata del Composto A aumentava il grado di inibizione del bersaglio. Negli xenotrapianti KARPAS-422 EZH2 Y461N mutante, il dosaggio per 28 giorni di Composto A su un programma BID aveva effetti molto più drammatici. L'inibizione della crescita tumorale è stata osservata a dosi basse di 80.5 mg/kg BID, ma dosi più alte eradicavano gli xenotrapianti, e nessuna ri-crescita è stata osservata per fino a 90 giorni dopo la cessazione del dosaggio. Quando programmi di dosaggio intermittente sono stati investigati in topi portanti xenotrapianti KARPAS-422, il Composto A mostrava nuovamente effetti antitumorali significativi dose dipendenti con due cicli di programmi 7 giorni si/7 giorni no e 21 giorni si/21 giorni no. Per tutti i programmi di dosaggio, l'inibizione della crescita tumorale e le regressioni complete sono state osservate a 90 e 361 mg/kg BID, rispettivamente. Il modello di xenotrapianto Pfeiffer EZH2 A677G mutante era il modello di tumore più sensibile, come suggerito dai potenti effetti anti-proliferativi del Composto A su questa linea cellulare in vitro. Tutti i gruppi di dosaggio del Composto A (programma QD) eccetto il più basso (30 mg/kg QD) mostravano regressioni tumorali complete in tutti gli animali. Di nuovo, la ri-crescita tumorale non è stata osservata fino al termine dello studio (36 giorni dopo l'arresto della somministrazione del Composto A). Sebbene la ri-crescita tumorale sia stata osservata a 30 mg/kg QD, questa dose molto bassa induceva la stasi del tumore durante il periodo di somministrazione. A causa di problemi di tollerabilità il dosaggio è stato fermato il giorno 12 per i topi a cui sono stati somministrati 1140 mg/kg QD; ancora, regressioni complete durevoli sono state osservate in questo gruppo che erano solo stati esposti al Composto A per 12 giorni.

**Il Composto A uccide selettivamente cellule MRT SMARCB1 mutanti *in vitro* e *in vivo*:**

E' stato testato se l'inibizione di EZH2 aveva degli effetti sulla crescita e la sopravvivenza di cellule MRT con SMARCB1 cancellato. Incubare linee cellulari MRT con SMARCB1 cancellato G401 e A204 con il Composto A in un saggio di proliferazione di 14 giorni *in vitro* induceva forti effetti anti-proliferativi con valori di IC<sub>50</sub> nel campo di variazione di nM mentre le linee cellulari di controllo RD e SJCRH30 che esprimevano SMARCB 1 erano minimamente influenzate (Tabella 3). Il dosaggio di topi SCID portanti xenotrapianti di G401 sottocutanei con il

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Composto A a 266 o 532 mg/kg BID per 28 giorni eliminava quei tumori a crescita estremamente veloce. Simile ai modelli di xenotrapianto NHL KARPAS-422 e Pfeiffer EZH2 mutante la ricrescita non è stata osservata al termine dello studio, 32 giorni dopo l'arresto del dosaggio. Il Composto A dosato a 133 mg/kg induceva stasi durante il periodo di somministrazione, e produceva un significativo ritardo della crescita tumorale in confronto al veicolo dopo l'arresto del dosaggio. I tumori che sono stati raccolti da sottoinsiemi di topi da ogni gruppo il giorno 21 mostravano una forte inibizione del bersaglio EZH2 a tutti i dosaggi.

**Il Composto A inibisce la metilazione di H3K27 in tessuti non tumorali in una maniera dose dipendente:** I dati descritti sopra dimostrano che il Composto A rappresenta una nuova modalità di trattamento per i cancro guidati da SWI/SNF e MRT. La misurazione della modulazione dei biomarcatori farmacodinamici post-dosaggio è spesso eseguita in sperimentazioni cliniche precoci per accertare il grado di inibizione del bersaglio che si predice che produrrà una risposta sulla base dei dati da modelli preclinici. Poiché la raccolta di biopsie tumorali post-dosaggio non è spesso possibile, sono spesso raccolti invece tessuti surrogati più facilmente accessibili come cellule mononucleate del sangue periferico (PBMC), pelle o midollo osseo. Per testare l'inibizione del bersaglio EZH2 in tessuti surrogati a ratti Sprague Dawley maschi e femmine sono stati somministrati oralmente 100, 300, o 1000 mg/kg di Composto A per 28 giorni, e campioni di PBMC, midollo osseo e pelle sono stati raccolti al termine dello studio. I livelli plasmatici del Composto A aumentavano in maniera dose-dipendente nei ratti sia maschi sia femmina, e i livelli plasmatici erano generalmente più alti nelle femmine in confronto a quelli nei maschi. A causa di problemi di tollerabilità, le femmine nel gruppo da 1000 mg/kg hanno dovuto essere sottoposte a eutanasia il giorno 23. L'inibizione del bersaglio dose-dipendente è stata osservata in PBMC e midollo osseo da ratti dosati con il Composto A, come misurato mediante ELISA. Il grado di inibizione del bersaglio era meno pronunciato per PBMC da femmine che erano state dosate per 22 giorni in confronto ai maschi che sono stati dosati per 28 giorni (medesima dose di 1000 mg/kg). Una riduzione dose dipendente nelle cellule H3K27Me3 positive è stata osservata nell'epidermide della pelle di ratti dosati con il Composto A, come accertato mediante un saggio IHC. L'effetto massimo è stato osservato alla dose più alta, ed era già evidente dopo 22 giorni di somministrazione del Composto A.

Il Composto A mostrava proprietà simili ad altri inibitori di EZH2 *in vitro*, come una specificità molto alta per EZH2 nei saggi biochimici quando confrontato con altri HMT e l'inibizione specifica della metilazione di H3K27 cellulare che porta all'uccisione ha ottenuto un aumento specifica per il contesto di linee cellulari NHL con EZH2 mutato. Tuttavia, questo composto ha ottenuto un aumento in potenza di approssimativamente 10 volte, riflesso dai valori diminuiti di  $K_i$  e  $IC_{50}$  determinati in saggi biochimici e di funzionalità cellulare. In aggiunta, il Composto A mostrava un'eccellente biodisponibilità orale quando somministrato a roditori il che porta a un'inibizione dose dipendente del

Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

bersaglio EZH2 in tessuti tumorali e non tumorali di xenotrapianti. Importante, il dosaggio del Composto A induceva effetti antitumorali significativi in topi che portavano xenotrapianti di linfoma con EZH2 mutante. Le risposte spaziavano dall'eradicazione del tumore (nessuna ricrescita dopo la cessazione del dosaggio) a inibizione della crescita tumorale dose-dipendente. L'avvio ritardato dell'attività antitumorale (dopo 4 a 7 giorni) era compatibile con la cinetica dell'inibizione della metilazione e dell'attività anti-proliferativa indotta dall'incubazione delle cellule con il Composto A *in vitro*. Tenere i livelli plasmatici del Composto A al di sopra di LCC per tutto un ciclo di dosaggio era necessario per il modello di xenotrapianto WSU-DLCL2 per indurre la massima inibizione del bersaglio e risposta antitumorale. Gli altri due modelli di xenotrapianto di linfoma (KARPAS-422 e Pfeiffer), tuttavia, erano estremamente sensibili alla somministrazione del Composto A, e mantenere i livelli plasmatici al di sopra di LCC non era necessario. I tumori di xenotrapianti Pfeiffer EZH2 A677G mutante scomparivano in maniera permanente con dosi molto basse o brevi periodi di dosaggio, suggerendo che pazienti con questo tipo di NHL geneticamente definito avessero un significativo effetto di trattamento con il Composto A.

MRT sono cancri pediatrici estremamente aggressivi del cervello, rene, e tessuti molli che sono altamente maligni, localmente invasivi, frequentemente metastatici, e particolarmente letali, ma essi sono tipicamente diploidi e privi di aberrazioni genetiche. Essi sono, tuttavia, caratterizzati da una quasi completa penetranza di perdita di espressione di SMARCB1, un componente centrale del complesso di rimodellazione della cromatina SWI/SNF. L'inattivazione biallelica di SMARCB1, per esempio indotta da mutazioni, è in pratica l'unico evento genetico in MRT che suggerisce un ruolo guida per questa aberrazione genetica. Attraverso studi genetici è stato suggerito che PRC2 e SWI/SNF regolino in maniera antagonista l'espressione genica intorno alla via di RB, Ciclina D1 e MYC. Qui, è stato dimostrato che l'inibizione farmacologica di EZH2 induceva effetti anti-proliferativi in linee cellulari MRT con SMARCB1 cancellato ed eradicava in maniera permanente xenotrapianti di MRT nei topi. Questo conferma la dipendenza di tali cancri, in cui lo stesso EZH2 non è geneticamente alterato, dall'attività di PRC2.

Il Composto A rappresenta una nuova modalità di trattamento per sottoinsiemi geneticamente definiti di NHL e per MRT. La capacità di misurare cambiamenti dose dipendenti nei livelli di H3K27Me3 nella pelle, in PBMC e nel midollo osseo fa presagire l'uso di un segnale da questi tessuti surrogati come biomarcatore farmacodinamico non invasivo in sperimentazioni cliniche umane.

**Tabella 1: Valori di IC<sub>50</sub> per la Metilazione e la Proliferazione come pure Valori di LCC per il Composto A in Linee Cellulari di**

**Linfoma Umano**

Linea Cellulare	Stato di EZH2	Metilazione IC <sub>50</sub> (nmol/L) <sup>a</sup>	Proliferazione IC <sub>50</sub> (µmol/L) <sup>b</sup>	LCC (µmol/L) <sup>b</sup>
DOHH-2	Tipo Selvatico	ND	1.7	>10

Linea Cellulare	Stato di EZH2	Metilazione IC <sub>50</sub> (nmol/L) <sup>a</sup>	Proliferazione IC <sub>50</sub> (μmol/L) <sup>b</sup>	LCC (μmol/L) <sup>b</sup>
Farage	Tipo Selvatico	ND	0.099	>10
OCI-LY19	Tipo Selvatico	8	6.2	10-25
Toledo	Tipo Selvatico	ND	7.6	>10
Karpas-422	Y641N	90	0.0018	0.12
Pfeiffer	A677G	2	0.00049	0.0005
RL	Y641N	22	5.8	>25
SU-DHL-10	Y641F	ND	0.0058	0.14
SU-DHL-6	Y641N	20	0.0047	0.21
WSU-DLCL2	Y641F	9	0.0086	0.17

a: Derivata dopo incubazione per 4 giorni con immunoblot. I valori rappresentano il risultato da un esperimento.

b: Derivata dopo incubazione per 11 giorni. Le incubazioni con il composto per ogni esperimento sono state eseguite in triplicato, e i valori rappresentano un esperimento per tutte le linee cellulari eccetto OCI-LY19, Pfeiffer, e WSU-DLCL2. Per le rimanenti tre linee cellulari, i valori rappresentano la media dal seguente numero di esperimenti: OCI-LY19 n=9; Pfeiffer n=2 e WSU-DLCL2 n=15.

**Tabella 2: Valori di LCC per il Composto A per Cellule di Linfoma Umano WSU-DLCL2 Dosato o Continuativamente o Dopo**

**Rimozione del Composto**

Rimozione di WSU-DLCL2	Giorno 11	Giorno 14
	LCC (μM)	LCC (μM)
Nessuna Rimozione	0.17	0.11
giorno-4 Composto A; giorno-11 Rimozione	0.36	0.42

Marco Giovanni Mari  
 USBM - GPL-090

Rimozione di WSU-DLCL2	Giorno 11	Giorno 14
	LCC ( $\mu\text{M}$ )	LCC ( $\mu\text{M}$ )
giorno-7 Composto A; giorno-7 Rimozione	0.19	0.075

I valori rappresentano la media di esperimenti in duplicato con tre replicati per concentrazione di incubazione negli esperimenti.

**Tabella 3: Valori di IC<sub>50</sub> per il Composto A per Linee Cellulari MRT SMARCB1 Negative e Linee Cellulari di Controllo**

**SMARCB1 Positive**

Linea Cellulare	Stato di SMARCB1	Proliferazione IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ), giorno 7	Proliferazione IC <sub>50</sub> ( $\mu\text{M}$ ), giorno 14
RD	Tipo Selvatico	9.2	5.2
SJCRH30	Tipo Selvatico	6.1	8.8
G401	Mutante	0.087	0.042
A204	Mutante	3.2	0.14

I valori rappresentano la media di esperimenti in duplicato con tre replicati per concentrazione di incubazione negli esperimenti.

**Esempio 2: Regressione Tumorale Durevole in Tumori Rabdoidi Maligni Geneticamente Alterati mediante Inibizione di EZH2**

**Il Composto A è un potente e selettivo inibitore di EZH2:** Il Composto A è stato sviluppato tramite chimica medica iterativa (Figura 10A). Il Composto A inibiva l'attività di PRC2 umano contenente EZH2 di tipo selvatico con un valore della costante di inibizione (Ki) di  $2.5 \pm 0.5$  nM, e una potenza simile è stata osservata per le proteine di EZH2 che portano tutte le mutazioni note di cambiamento di funzione di linfoma (Tabella 5). Si è trovato che il composto è SAM-competitivo e nucleosoma-non competitivo mediante studi cinetici in fase stazionaria (Figura 11). E' stata anche accertata l'inibizione mediante il Composto A contro un pannello di HMT diversi da EZH2 che racchiude HMT sia di lisina sia di arginina. Il Composto A mostrava una selettività di 35 volte contrapposto a EZH1 e una selettività >4500 volte rispetto a 14 altri HTM testati (Tabella 5)

**Tabella 4: Inibizione di Istone Metiltransferasi mediante il Composto A**

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Saggio Enzimatico	IC <sub>50</sub> (nM)	% Inibizione a 1 μM Composto A <sup>a</sup>
CARM1	>50,000 <sup>b</sup>	5 ± 3
DOT1L	>50,000 <sup>c</sup>	2 ± 8
EHMT1	>50,000 <sup>c</sup>	6 ± 6
EHMT2	>50,000 <sup>c</sup>	7 ± 3
EZH1 <sup>d,e</sup>	392 ± 72 <sup>f</sup>	98 ± 1
EZH2 Saggio con peptide <sup>e</sup>	11 ± 5 <sup>f</sup>	ND
EZH2 Saggio con Nucleosoma <sup>d</sup>	16 ± 12 <sup>f</sup>	100 ± 1
A677G EZH2 <sup>d,e</sup>	2 <sup>b</sup>	ND
A687V EZH2 <sup>d,e</sup>	2 <sup>b</sup>	ND
Y641F EZH2 <sup>d,e</sup>	14 ± 5 <sup>f</sup>	ND
Y641C EZH2 <sup>d,e</sup>	16 <sup>c</sup>	ND
Y641H EZH2 <sup>d,e</sup>	6 <sup>c</sup>	ND
Y641N EZH2 <sup>d,e</sup>	38 <sup>b</sup>	ND
Y641S EZH2 <sup>d,e</sup>	6 <sup>c</sup>	ND
rat EZH2 <sup>d,e</sup>	4 <sup>c</sup>	ND
PRMT1	>50,000 <sup>c</sup>	5 ± 4
PRMT3	ND	2 ± 2
PRMT5/MEP50	>50,000 <sup>c</sup>	2 ± 6
PRMT6	ND	3 ± 3

Marco Giovanni Mari  
 USBM - CPI-090

Saggio Enzimatico	IC <sub>50</sub> (nM)	% Inibizione a 1 µM Composto A <sup>a</sup>
PRMT8	>50,000 <sup>e</sup>	7 ± 3
SETD7	ND	4 ± 3
SMYD2	>50,000 <sup>e</sup>	1 ± 2
SMYD3	ND	0 ± 5
WHSC1	>100,000 <sup>e</sup>	8 ± 3
WHSC1L1	>100,000 <sup>e</sup>	9 ± 8

a: I valori rappresentano la media e la deviazione standard di esperimenti in duplicato determinati a 10 µmol/L Composto A

b: I valori rappresentano la media di esperimenti in duplicato con due replicati per esperimento.

c: I valori rappresentano un esperimento con due replicati per esperimento.

d: Tutte le proteine EZH1 e EZH2 sono state saggiate nel contesto di 4 componenti di PRC2 (EZH1/2, SUZ12, RBAP48, EED).

e: Saggiato con peptidi di H3K27 come substrati.

**Il composto A inibisce in maniera specifica la metilazione di H3K27 cellulare portando all'uccisione apoptotica selettiva di cellule MRT SMARCB1 mutanti:** Un pannello di cellule MRT SMARCB1 deficienti e cellule di controllo SMARCB1 di tipo selvatico (confermato mediante immunoblot, Figura 12A) sono state trattate con il Composto A per 4 giorni, risultando in riduzioni concentrazione dipendenti nei livelli di H3K27Me3 globale (Figura 10B e Tabella 6). Il trattamento di cellule di tipo selvatico o mutanti è risultato nella diminuzione solo dei marchi metilici su H3K27, con nessun altro marchio di istone metil che è colpito (Figura 12B). Il trattamento *in vitro* di linee cellulari MRT con SMARCB1 cancellato con il Composto A induceva forti effetti anti-proliferativi con valori di IC<sub>50</sub> nel campo di variazione nM; mentre le linee cellulari controllo (tipo selvatico) erano colpite minimamente (Figura 10C e Tabella 6). Gli effetti anti-proliferativi erano evidenti in cellule MRT con SMARCB1 cancellato dopo 7 giorni di esposizione al composto, ma richiedevano 14 giorni di esposizione per l'attività massima. Gli effetti dell'incubazione con il Composto A (1 µM) per 14 giorni sulla progressione del ciclo cellulare e sull'apoptosi in cellule G401 e RD sono stati anche accertati. L'incubazione con il Composto A di cellule di tipo selvatico RD SMARCB1 ha mostrato nessun cambiamento nel ciclo cellulare o

Marco Giovanni Mari  
 USBM - CPF-090

nell'apoptosi in confronto al controllo con DMASO (Figura 13A). In contrasto, cellule SMARCB1 cancellate G401 mostravano un aumento nella percentuale di cellule in fase G<sub>1</sub>, e una concomitante diminuzione in fase S e in fase G<sub>2</sub>/M dopo 7 giorni (Figura 13B). Non c'era un aumento evidente nella frazione sub-G<sub>1</sub> fino al giorno 7, suggerendo che l'apoptosi non fosse in quel momento ancora indotta. Questo coincide con le curve di crescita delle cellule G401 in presenza del Composto A che mostrano citotossicità solo dopo 7 giorni di incubazione (Figura 10C). Successivamente al trattamento con il Composto A di cellule G401 per fino a 14 giorni, la frazione di cellule in sub-G<sub>1</sub> come pure le cellule apoptotiche determinate mediante saggio TUNEL aumentavano in maniera tempo dipendente tramite i giorni 11 e 14, indicando che la morte cellulare mediata dal Composto A si verificava attraverso l'induzione dell'apoptosi (Figura 13B).

**Tabella 6**

<b>Linea cellulare</b>	<b>Stato di SMARCB1</b>	<b>Metilazione IC<sub>50</sub> (nM)<sup>a</sup></b>	<b>Proliferazione IC<sub>50</sub> il Giorno 14 (nM)<sup>b</sup></b>
G401	mutante	2.7	135
A204	mutante	1.4	590
G402	mutante	1.7	144
KYM-1	mutante	4.3	32
RD	tipo selvatico	5.6	6100, > 10000 <sup>c</sup>
293	tipo selvatico	2.4	> 10000
SJCRH30	tipo selvatico	4.9	5100, >10000 <sup>c</sup>

a: Derivato dopo incubazione per 4 giorni, estrazione di istoni, immunoblot e densitometria. I valori rappresentano la media da due esperimenti.

b: Le incubazioni con il composto per ogni esperimento sono state eseguite in triplicato, e i valori rappresentano la media di 2 esperimenti per tutte le linee cellulari.

c: Il calcolo della media di un esperimento in duplicato non è possibile.

**Il Composto A induce geni della differenziazione neuronale e dell'inibizione del ciclo cellulare mentre sopprime l'espressione di**

**geni della via del riccio, MYC e EZH2:** E' stato suggerito che la perdita di SMARCB1 guida la formazione di cancro tramite la simultanea perturbazione epigenetica di vie del cancro chiave. I dati presenti hanno confermato l'espressione ridotta precedentemente descritta di geni importanti per la differenziazione neuronale (*CD133*, *DOCK4*, *PTPRK*), l'inibizione del ciclo cellulare (*CDKN2A*) e la soppressione tumorale (*BINI*), come pure l'espressione aumentata del gene della via del riccio *GLI1* in cellule G401 con *SMARCB1* cancellato in confronto a cellule di controllo (Figura 14A). Il trattamento con il Composto A di cellule G401 per fino a 7 giorni induceva fortemente l'espressione di *CD133*, *DOCK4* e *PTPRK* e regolava in senso incrementante gli inibitori del ciclo cellulare *CDKN1A* e *CDKN2A* e il soppressore tumorale *BINI*, tutto in una maniera dipendente dal tempo (Figura 14B). Simultaneamente, l'espressione dei geni della via del riccio, *MYC* e *EZH2* erano ridotte. Da notare, le cellule G402 con *SMARCB1* cancellato esposte al Composto A per 14 giorni assumevano una morfologia neurone-simile (Figura 14C). In contrasto, l'incubazione con il Composto A di cellule di controllo RD aveva effetti minimi sull'espressione dei geni sopra menzionati.

**Il Composto A eradica xenotrapianti di MRT con SMARCB1 mutante:** Il dosaggio orale del Composto A ha portato all'esposizione sistemica del composto, all'inibizione del bersaglio *in vivo* e all'attività antitumorale in topi che portavano xenotrapianti di MRT con *SMARCB1* cancellato. E' stato eseguito uno studio in topi SCID portanti xenotrapianti di G401 sottocutanei in cui gli animali erano dosati per 21 giorni con il Composto A. Metà dei topi per gruppo sono stati sottoposti a eutanasia il giorno 21 per raccogliere sangue e tessuti, mentre i restanti animali sono stati trattati per 7 giorni aggiuntivi e quindi lasciati senza dosaggio per altri 32 giorni. Il Composto A era ben tollerato a tutte le dosi con un effetto minimo sul peso corporeo (Figura 15A). Dosaggi a 250 o 500 mg/kg due volte al giorno (BID) per 21 a 28 giorni eliminavano praticamente i tumori G401 a crescita rapida (Figure 15B, 14C e 16A). La ri-crescita non è stata osservata per 32 giorni dopo la cessazione delle dosi. Il Composto A dosato a 125 mg/kg induceva la stasi tumorale durante il periodo della somministrazione, e produceva un significativo ritardo nella crescita tumorale in confronto al veicolo dopo il periodo di dosaggio. Misurare i livelli plasmatici di Composto A o 5 minuti prima o 3 ore dopo il dosaggio il giorno 21 ha rivelato un chiaro aumento dose dipendente nell'esposizione sistemica (Figura 15D). I tumori che sono stati raccolti dai sottoinsiemi di topi da ogni gruppo il giorno 21 mostravano una forte inibizione di H3K27me3, che si correla all'attività anti-tumorale (effetto massimo ottenuto a 250 mg/kg, Figura 16B). In aggiunta, i cambiamenti dose dipendenti nell'espressione di *CD133*, *PTPRK*, *DOCK4* e *GLI1* sono stati rivelati nei tumori con xenotrapianto di G401 (Figura 16C).

I presenti dati dimostrano che l'inibizione farmacologica di EZH2 induceva effetti anti-proliferativi specificamente in linee cellulari MRT con *SMARCB1* cancellato ed eradicavano in maniera permanente xenotrapianti di MRT nei topi. Questo conferma la dipendenza di tali cancri dall'attività di PRC2, nonostante il fatto che lo stesso EZH2 non sia geneticamente alterato in questo contesto. I dati presentati qui mostrano

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

che nel contesto di MRT con SMARCB1 cancellato, l'inibizione di EZH2 funziona come un surrogato di SMARCB1 e de-reprime i geni della differenziazione neuronale, gli inibitori del ciclo cellulare e i soppressori tumorali riducendo al contempo *GLI1*, *PTCH1*, *MYC* and *EZH2*. La somma degli effetti dell'inibizione di EZH2 mediata dal Composto A su parecchie vie di cancri è la causa della drammatica e permanente attività anti-tumorale vista nei modelli MRT. Pertanto, il Composto A rappresenta una nuova modalità di trattamento per questi tumori pediatrici letali.

Inoltre, poiché parecchi membri del complesso SWI/SNF sono geneticamente alterati in altri tipi di cancro oltre a MRT, è plausibile che EZH2 giochi anche un ruolo nel mantenimento del tumore e nella sopravvivenza in uno spettro di tipi di cancro. Combinati con recenti rapporti che dimostrano l'efficacia degli inibitori di EZH2 nell'uccisione selettiva di linfomi non Hodgkin portanti EZH2 mutante, i dati presenti dimostrano che l'inibizione di EZH2 basata su piccole molecole è un meccanismo efficace di intervento terapeutico in una varietà di tumori ematologici e solidi per i quali alterazioni genetiche - o dirette al bersaglio o indirette - conferiscono una dipendenza proliferativa dall'attività enzimatica di EZH2.

### **Esempio 3: Materiali e Metodi**

**Coltura Cellulare:** Le linee cellulari 293T, RD, SJCRH30, A204, G401, G402, e KYM-1. 293T (CRL-11268), RD (CRL-136), SJCRH30 (CRL-2061), A204 (HTB-82), G401 (CRL-1441), e G402 (CRL-1440) sono state ottenute da ATCC. KYM-1 (JCRB0627) è stato ottenuto da JCRB. Le cellule 293T e RD sono state coltivate in DMEM+10% FBS. Le cellule SJCRH30 sono state coltivate in RPMI+10% FBS. Le cellule A204, G401, e G402 sono state coltivate in McCoy's 5a+10% FBS. Le cellule KYM-1 sono state coltivate in DMEM/Ham's F12+10% FBS.

**Analisi Western blot:** Gli istoni sono stati estratti con acido come precedentemente descritto (Daigle et al., Blood. 2013 Aug 8;122(6):1017-25). I Western blot per gli istoni estratti con acido sono stati eseguiti come precedentemente descritto (Knutson et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Maggio 7;110(19):7922-7). I lisati di cellule intere (WCL) sono stati preparati usando un tampone RIPA modificato (10x Tampone per Lisi RIPA (Millipore #20-188), 0.1% SDS (Invitrogen AM9823), mini compresse di proteasi (Roche #1836153)). Le cellule sono state fatte precipitare, lavate con PBS ghiacciato, risospese in tampone RIPA ghiacciato, e incubate su ghiaccio per 5 minuti. I lisati sono stati sottoposti a sonicazione 3x per 10 secondi a 50% della potenza, quindi incubati su ghiaccio per 10 minuti. I lisati sono stati quindi centrifugati a velocità massima per 15 minuti a 4 gradi in una centrifuga da tavolo. I lisati chiarificati sono stati suddivisi in aliquote in una provetta nuova, e sono state determinate le concentrazioni proteiche per WCL mediante un saggio BCA (Pierce). Dieci microgrammi di ogni lisato sono stati frazionati su gel 10-20% Tris-Glycine (Biorad), trasferiti usando iBlot (7 minuti sul programma 3, usando pile di trasferimento di Nitrocellulosa), e sondati con i seguenti anticorpi in tampone bloccante Odyssey: SNF5 (CST #8745), EZH2 (CST #5246), e Beta-actina (CST #3700).

**Saggi cellulari *in vitro*:** Per i saggi di proliferazione delle linee cellulari aderenti (tutte le linee cellulari eccetto KYM-1, che è stata

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

analizzata come precedentemente descritto per le linee cellulari in sospensione (Daigle et al., Blood. 2013 Aug 8;122(6):1017-25), le densità di piastratura per ogni linea cellulare sono state determinate sulla base delle curve di crescita (misurate mediante la vitalità ATP) e la densità in un decorso temporale di 7 giorni. Il giorno prima del trattamento con il composto, le cellule sono state piastrate o in piastre a 96 pozzetti in triplicato (per il decorso temporale dal giorno 0-7) o in piastre a 6 pozzetti (per ripiastrare il giorno 7 per il resto del decorso temporale). Il giorno 0, le cellule sono state o non trattate, trattate con DMSO, o trattate con il Composto A iniziando a 10uM e diminuendo in diluizioni di o 3 o 4 volte. Le piastre sono state lette il Giorno 0, il Giorno 4, e il Giorno 7 usando CellTiter-Glo® (Promega), con il composto/terreno che viene rifornito il Giorno 4. Il Giorno 7, le piastre a 6 pozzetti sono state tripsinizzate, centrifugate, e risospese in terreno fresco per la conta mediante Vi-Cell. Le cellule da ogni trattamento sono state ripiastrate alla densità originale in piastre a 96 pozzetti in triplicato. Le cellule sono state lasciate aderire alla piastra per tutta la notte, e le cellule sono state trattate come al Giorno 0. Il Giorno 7, 11 e 14, le piastre sono state lette usando CellTiter-Glo®, con il composto/terreno che viene rifornito il Giorno 11. Le medie dei triplicati sono state usate per riportare su grafico la proliferazione durante il decorso temporale, e calcolare i valori di IC50. Per il ciclo cellulare e l'apoptosi, le cellule G401 e RD sono state piastrate in piastre di 15 cm in duplicato a una densità di  $1 \times 10^6$  cellule per piastra. Le cellule sono state incubate con il Composto A a 1 uM, in un totale di 25 mL, durante un periodo di 14 giorni, con le cellule che sono ridivise alla densità di piastratura originale il giorno 4, 7 e 11. L'analisi del ciclo cellulare e il saggio TUNEL sono stati eseguiti usando un citometro a flusso Guava®, seguendo le istruzioni del produttore.

**Analisi dell'Espressione Genica:** cellule G401 e RD sono state piastrate in fiasche T-75 a 175000 cellule/fiasca e 117000 cellule/fiasca rispettivamente e lasciate aderire per tutta la notte. Il Giorno 0, le cellule sono state trattate in duplicato con DMSO o 1uM Composto A. Le cellule sono state raccolte e fatte precipitare il Giorno 2, 4 e 7 con il terreno e il composto che sono riforniti il Giorno 4. Tessuto tumorale da animali con xenotrapianto di G401 dosati per 21 giorni (veicolo, gruppi con dose di Composto A di 125 mg/kg, e 250 mg/kg (6 animali ognuno) e 500 mg/kg (4 animali)) sono stati usati per l'analisi dell'espressione genica. L'mRNA totale è stato estratto dal precipitato cellulare e dal tessuto tumorale usando il corredo RNeasy Mini Kit (Qiagen #74106) e trascritto all'inverso mediante il corredo High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems (AB) #4368813). La RT-PCR è stata eseguita tramite ViiA™ 7 Real-Time PCR Systems (AB) usando TaqMan Fast Advanced Master Mix (AB #4444964) e i gruppi di innesco/sonda TaqMan nella tabella sotto. L'espressione genica è stata normalizzata a 18S (AB #Hs99999901\_s1) e il cambiamento in volte è stato calcolato usando il procedimento  $\Delta\Delta Ct$ . Per i campioni in vivo, il valore medio di Ct +/- SD è stato determinato per ogni gruppo di dosi e il cambiamento in volte confrontato al gruppo di dose del veicolo è stato calcolato usando il procedimento  $\Delta\Delta Ct$ .

<u>Gene</u>	<u>AB#</u>
MYC	Hs00153408_m1
EZH2	Hs00172783_m1
PTCH1	Hs00181117_m1
PROM1 (CD133)	Hs01009250_m1
GLI1	Hs01110766_m1
DOCK4	Hs00206807_m1
PTPRK	Hs00267788_m1
BIN1	Hs00184913_m1

**ELISA:** Gli istoni sono stati isolate dai tumori come precedentemente descritto (Daigle et al) e sono stati preparati in concentrazioni equivalenti (0.5 ng/ul per H3 e 4 ng/ul per H3K27Me3) in tampone di rivestimento (PBS con 0.05% BSA). Il campione o lo standard (100 µL) è stato aggiunto in duplicato a due piastre per ELISA a 96 pozzetti (Thermo LabSystems, Immulon 4HBX #3885). Gli istoni isolati da cellule G401 che sono state trattate con DMSO o 10 µmol/L di Composto A per 4 giorni sono stati aggiunti ai pozzetti di controllo alla medesima concentrazione di istoni dei campioni di istoni tumorali. Le piastre sono state sigillate e incubate per tutta la notte a 4°C. Il giorno seguente, le piastre sono state lavate 3 volte con 300 µL/pozzetto di PBST (PBS con 0.05% Tween 20; 10x PBST, KPL #51-14-02) su un lava piatti Bio Tek. Le piastre sono state bloccate con 300 µL/pozzetto di diluente (PBS + 2% BSA + 0.05% Tween 20), incubate a temperatura ambiente per 2 ore, e lavate 3 volte con PBST. Tutti gli anticorpi sono stati diluiti in diluente. 100 uL/pozzetto di anti-H3K27Me3 (CST #9733, 50% soluzione madre di glicerolo 1:1000) o anti-H3 totale (Abcam #ab1791, 50% soluzione madre di glicerolo 1:10,000) sono stati aggiunti a ogni pozzetto. Le piastre sono state incubate per 90 minuti a temperatura ambiente e lavate 3 volte con PBST. 100 µL/pozzetto di anti-Rb-IgG-HRP (Cell Signaling Technology, 7074) sono stati aggiunti 1:2000 alla piastra di H3K27Me3 e 1:6000 alla piastra di H3 e incubate per 90 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate 4 volte con PBST. Per la rivelazione, 100 µL/pozzetto di substrato per TMB (BioFx Laboratories, #TMBS) sono stati aggiunti e le piastre incubate al buio a temperatura ambiente per 5 minuti. La reazione è stata arrestata con 100 µL/pozzetto 1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. L'assorbanza a 450 nm è stata letta su un lettore per micropiastre SpectraMax M5.

**Studio degli xenotrapianti:** Tutte le procedure relative alla manipolazione, cura e trattamento degli animali in questo studio sono state eseguite secondo le linee guida approvate dal Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) of Shanghai Chemparner che seguono le direttive della Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care (AAALAC). Per lo studio *in vivo*, i topi sono stati inoculati nel fianco destro con cellule di tumore G401 (5x10<sup>6</sup> /topo) in 0.2 ml di miscela di terreno base e Matrigel (McCoy's 5A : Matrigel=1:1) per lo sviluppo del tumore. I trattamenti sono iniziati quando la dimensione del tumore ha raggiunto approssimativamente 157 mm<sup>3</sup> per lo studio di efficacia sul tumore (n=16 topi per gruppo). Il Composto A o il veicolo (0.5% NaCMC+0.1% Tween-80 in acqua) è stato somministrato oralmente

Marco Giovanni Mari  
USBM CPI-090

BID a un volume della dose di 10µL/g per o 21 o 28 giorni. I pesi corporei degli animali sono stati misurati ogni giorno durante la prima settimana, quindi due volte alla settimana per il resto dello studio. La dimensione del tumore è stata misurata due volte alla settimana in due dimensioni usando un calibro, e il volume è stato espresso in mm<sup>3</sup>. Per l'analisi PK/PD, 8 topi con il carico tumorale più grande sono stati sottoposti a eutanasia per la raccolta del tumore e del sangue dopo 21 giorni di dosaggio. I topi restanti hanno continuati il dosaggio per un'altra settimana, e dal giorno 29, il trattamento è stato arrestato e i topi sono stati coinvolti in uno studio del ritardo di crescita del tumore. I topi sono stati osservati come individui finché hanno raggiunto il punto finale del peso del tumore (2000mm<sup>3</sup>) o fino al giorno 60 (quale dei due arriva primo).

**Analisi farmacocinetiche:** Il dexametasone è stato usato come standard interno. Un'aliquota di 30 µL di campione di plasma è stata aggiunta con 30 µL IS (Dexametasone, 1000 ng/mL) e 150 µL ACN. La miscela è stata sottoposta a vorticazione per 5 minuti e centrifugata a 14000 rpm per 5 minuti. Un'aliquota di 2 µL di supernatante è stata iniettata per l'analisi LC-MS/MS (Q-trap 3200). Per campioni di plasma diluiti 10 volte un'aliquota di 3 µL di campione di plasma è stata addizionata con 27 µL di plasma vuoto, il fattore di diluizione era 10, quindi addizionata con 30 µL IS (Dexametasone, 1000 ng/mL) e 150 µL ACN. La miscela è stata sottoposta a vorticazione per 5 minuti e centrifugata a 14000 rpm per 5 minuti. Un'aliquota di 2 µL di supernatante è stata iniettata per l'analisi LC-MS/MS. I campioni di tumore sono stati omogeneizzati su Beadbeater® per 30 secondi con 3 x PBS (p/v) per ottenere un omogenato di tumore. Un'aliquota di 30 µL di campione di omogenato di tumore è stata addizionata con 30 µL IS (Dexametasone, 1000 ng/mL) e 150 µL ACN. La miscela è stata sottoposta a vorticazione per 5 minuti e centrifugata a 14000 rpm per 5 minuti. Un'aliquota di 2 µL di supernatante è stata iniettata per l'analisi LC-MS/MS.

#### **Esempio 4: Procedure sperimentali generali**

##### **NMR**

Spettri <sup>1</sup>H-NMR sono stati acquisiti usando CDCl<sub>3</sub> se non altrimenti indicato e sono stati registrati a 400 o 500 MHz usando uno strumento magnetico Varian o Oxford instruments (500 MHz). Le molteplicità indicate sono s=singoletto, d = doppietto, t = tripletto, q = quartetto, quint = quintetto, sxt = sestetto, m = multipletto, dd =doppietto di doppietti, dt = doppietto di tripletto; br indica un segnale ampio.

##### **LCMS e HPLC**

Shimadzu LC-Q, Shimadzu LCMS-2010EV o Waters Acquity Ultra Performance LC. HPLC: I prodotti sono stati analizzati mediante Shimadzu SPD-20A con una colonna 150 x 4.5mm YMC ODS-M80 o una colonna 150 x 4.6mm YMC-Pack Pro C18 a 1.0ml/min.

La fase mobile era MeCN:H<sub>2</sub>O=3:2 (contenente 0.3% SDS e 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>),

0.05% TFA in acqua, 0.05% TFA in acetonitrile (gradiente Iniziale 20 %, quindi 0.05%TFA/MeCN a conc. a 95 % in 3 minuti tenere per

Marco Giovanni Mari  
USBM-CP-090

0.5 minuti a 3.51 a 4.50 minuti quindi 0.05%TFA/MeCN conc. 20 %).

Alternativamente LCMS, sono stati usati 2 procedimenti differenti; quello che usiamo di più è il pH alto (METCR1600) e l'altro per composti più standard (METCR1416).

0.1% Acido formico in acqua - Fase mobile "A" 0.1% Acido formico in acetonitrile - Fase mobile "B" utilizzando una colonna Waters Atlantis dC18, 2.1 mm x 100 mm, 3µm, con una velocità di flusso = 0.6 ml/min Temperatura della colonna = 40°C; Tempo (minuti) %B 0.00 minuti 5% B. 5.0 minuti 100% B, 5.4 minuti 100% B e .42 minuti 5%B

il procedimento a 3.5 minuti si riferisce a una colonna Atlantis dC18, 2.1 mm x 50 mm, 3µm, velocità di flusso di 1ml/min a 40C. Fase mobile A Acido formico (aq.) 0.1% Fase mobile B Acido formico (MeCN) 0.1%, iniezione 3 µL, gradiente 0 minuti (5% organico), 2.5 minuti (100 % organico), 2.7 minuti (100 % organico), 2.71 minuti (5% organico), 3.5 minuti (5% organico)

il procedimento a 7.0 minuti si riferisce a una colonna Atlantis dC18, 2.1 mm x 100 mm, 3µm, velocità di flusso di 0.6ml/min a 40C. Fase mobile A Acido formico (aq.) 0.1% Fase mobile B Acido formico (MeCN) 0.1%, iniezione 3 µL, gradiente 0 minuti (5% organico), 5 minuti (100 % organico), 5.4 minuti (100 % organico), 5.42 minuti (5% organico), 7 minuti (5% organico)

Entrambi i procedimenti a 3.5 e 7 minuti sono stati eseguiti su un sistema MS18 Shimadzu LCMS-2010EV o uno MS19 Shimadzu LCMS-2010EV utilizzando pompe LC-20AB e rivelatori SPD-M20A PDA.

I prodotti sono stati purificati mediante HPLC/MS usando il sistema Waters AutoPurification System con il rivelatore 3100 Mass Detector.

Le analisi in HPLC possono anche essere eseguite su un Shimadzu LC-2010CHT usando una colonna YMC ODS-A, C18, (150x4.6 x5 µm) a temperatura ambiente con una velocità di flusso di 1.4 ml/min. E' utilizzato un volume di iniezione di 10 µl e la rivelazione si verifica via UV/PDA. La fase mobile A è 0.05 % TFA in acqua e la Fase Mobile B è 0.05 % TFA in acetonitrile con un programma di gradiente di Iniziale 5 % B a 95 % B in 8 minuti, tenere per 1.5 minuti, a 9.51 a 12 minuti B. conc. 0.5 %. Il diluente è la fase mobile

#### **Altro**

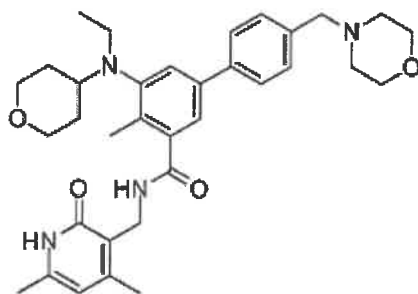
La cromatografia flash su colonna automatizzata è stata eseguita su una Biotage Isolera versione 4. Cartuccia SNAP 10g che corre a 12 ml/min o una cartuccia SNAP 25g che corre a 25 ml/min e rivelando a 254 nm e 280 nm.

Le riduzioni a Nitrile Select possono essere eseguite su un ThalesNano H-Cube® secondo le condizioni descritte nella procedura sperimentale.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

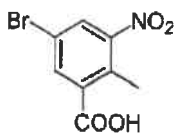
Altre procedure generali correlate si possono anche trovare nella pubblicazione PCT N. WO12/118812, domanda PCT N. PCT/US2012/033648 e domanda PCT N. PCT/US2012/033662, ognuna delle quali è qui incorporata per riferimento nella sua interezza.

**Esempio 5:** Sintesi di N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetraidro-2H-piran-4-il)ammino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide



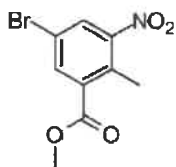
Composto A

Passaggio 1: Sintesi di acido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico



A una soluzione agitata di acido 2-metil-3-nitrobenzoico (100 g, 552 mmol) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (400 mL), è stato aggiunto 1,3-dibromo-5,5-dimetil-2,4-imidazolidinedione (88 g, 308 mmol) a porzioni a temperatura ambiente e la miscela di reazione è stata quindi agitata a temperatura ambiente per 5 ore. La miscela di reazione è stata versata su acqua ghiacciata, il precipitato solido è stato rimosso mediante filtrazione, lavato con acqua ed essiccato sotto vuoto per dare il composto desiderato come un solido (140 g, 98%). Il composto isolato è stato preso direttamente nel passaggio successivo. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8.31 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 2.43 (s, 3H).

Passaggio 2: Sintesi di metil 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoato

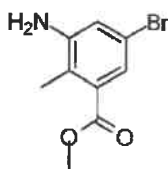


A una soluzione agitata di acido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico (285 g, 1105 mmol) in DMF (2.8L) a temperatura ambiente è stato

Marco Giovanni Mari  
USBM - GPL090

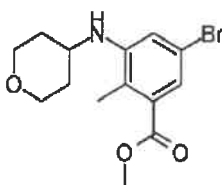
aggiunto sodio carbonato (468 g, 4415 mmol) seguito dall'aggiunzione di metil ioduro (626.6 g, 4415 mmol). La miscela di reazione risultante è stata scaldata a 60 °C per 8 ore. Dopo completamento (monitorato mediante TLC), la miscela di reazione è stata filtrata (per rimuovere sodio carbonato) e lavata con etil acetato (1L X 3). Il filtrato combinato è stato lavato con acqua (3L X 5) e la fase acquosa è stata di nuovo estratta con etil acetato (1L X 3). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta per dare il composto del titolo come un solido (290g, 97% resa). Il composto isolato è stato preso direttamente nel passaggio successivo. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.17 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

Passaggio 3: Sintesi di metil 3-ammino-5-bromo-2-metilbenzoato



A una soluzione agitata di metil 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoato (290 g, 1058 mmol) in etanolo (1.5L) è stato aggiunto ammonio cloruro acquoso (283 g, 5290 mmol sciolto in 1.5L di acqua). La miscela risultante è stata agitata a 80°C a cui polvere di ferro (472 g, 8451 mmol) è stata aggiunta a porzioni. La miscela di reazione risultante è stata scaldata a 80 °C per 12 ore. Al completamento come determinato mediante TLC, la miscela di reazione è stata filtrata a caldo su celite® e il letto di celite è stato lavato con metanolo (5L) seguito da lavaggio con 30% MeOH in DCM (5L). Il filtrato combinato è stato concentrato sotto vuoto, il residuo ottenuto è stato diluito con una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio (2L) ed estratto con etil acetato (5L X 3). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta per dare il composto del titolo come un solido (220 g, 85%). Il composto è stato preso direttamente nel passaggio successivo. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.37 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.80 (bs, 2H), 2.31 (s, 3H).

Passaggio 4: Sintesi di metil 5-bromo-2-metil-3-((tetraidro-2H-piran-4-il) ammino) benzoato

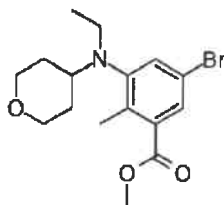


A una soluzione agitata di metil 3-ammino-5-bromo-2-metilbenzoato (15 g, 61.5 mmol) e diidro-2H-piran-4(3)-one (9.2 g, 92 mmol) in dicloroetano (300 mL) è stato aggiunto acido acetico (22 g, 369 mmol) e la miscela di reazione agitata a temperatura ambiente per 15 minuti, quindi

Marco Giovanni Mari  
 USBM - CPI-090

la miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C e sodio triacetossiboroidruro (39 g, 184 mmol) è stato aggiunto. La miscela di reazione è stata agitata per tutta la notte a temperatura ambiente. Al completamento della reazione come determinato mediante TLC, una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio è stata aggiunta alla miscela di reazione finché si è ottenuto un pH di 7-8. La fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta. Il composto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice 100-200 maglie) eluendo con etil acetato:esano per dare il composto desiderato come un solido (14 g, 69%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 7.01 (s, 1H), 6.98 (s, 1H), 5.00 (d, 1H, J=7.6 Hz), 3.84-3.87 (m, 2H), 3.79 (s, 3H), 3.54-3.56 (m, 1H), 3.43 (t, 2H, J=12 Hz), 2.14 (s, 3H), 1.81-1.84 (m, 2H), 1.47-1.55 (m, 2H).

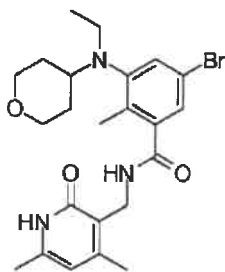
Passaggio 5: Sintesi di metil 5-bromo-3-(etil (tetraidro-2H-piran-4-il) ammino)-2-metilbenzoato



A una soluzione agitata di metil 5-bromo-2-metil-3-((tetraidro-2H-piran-4-il) ammino) benzoato (14 g, 42.7 mmol) in dicloroetano (150 mL) è stato aggiunto acetaldeide (3.75 g, 85.2 mmol) e acido acetico (15.3 g, 256 mmol). La miscela di reazione risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 15 minuti. La miscela è stata raffreddata a 0 °C e sodio triacetossiboroidruro (27 g, 128 mmol) è stato aggiunto. La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 3 ore. Al completamento della reazione come determinate mediante TLC, una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio è stata aggiunta alla miscela di reazione finché si è ottenuto un pH di 7-8, la fase organica è stata separata e la fase acquosa è stata estratta con etil acetato. Gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta. Il composto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice 100-200 maglie) eluendo con etil acetato:esano per dare il composto desiderato come un liquido viscoso (14 g, 93%). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 7.62 (s, 1H), 7.52 (s, 1H), 3.80 (bs, 5H), 3.31 (t, 2H), 2.97-3.05 (m, 2H), 2.87-2.96 (m, 1H), 2.38 (s, 3H), 1.52-1.61 (m, 2H), 1.37-1.50 (m, 2H), 0.87 (t, 3H, J=6.8 Hz).

Passaggio 6: Sintesi di 5-bromo-N-((4, 6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-3-(etil(tetraidro-2H-piran-4-il)ammino)-2-metilbenzamide

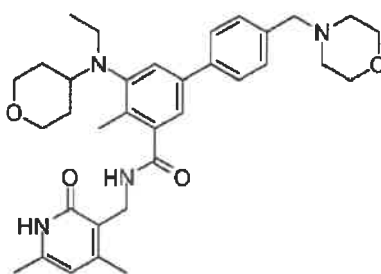
Marco Giovanni Mari  
USBM CPI-090



A una soluzione agitata di 5-bromo-3-(etil (tetraidro-2H-piran-4-il) ammino)-2-metilbenzoato (14 g, 39.4 mmol) in etanolo (100 mL) è stato aggiunto NaOH acquoso (2.36 g, 59.2 mmol in 25mL di acqua) e la miscela risultante è stata agitata a 60 °C per 1 ora. Al completamento della reazione come determinate mediante TLC, il solvente è stato rimosso in pressione ridotta e il residuo ottenuto è stato acidificato con HCl 1N finché non si è ottenuto un pH 7 e quindi è stata aggiunta una soluzione acquosa di acido citrico finché non si è ottenuto un pH 5-6. Lo strato acquoso è stato estratto con 10% MeOH in DCM (200mL X 3), gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta per dare l'acido rispettivo (14 g, 100%).

Il suddetto acido (14 g, 40.9 mmol) è stato quindi sciolto in DMSO (70 mL) e 3-(ammino metil)-4, 6-dimetilpiridin-2(1H)-one (12.4 g, 81.9 mmol) è stato aggiunto a esso. La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 15 minuti, quindi PYBOP (31.9 g, 61.4 mmol) è stato aggiunto e l'agitazione è stata continuata per tutta la notte a temperatura ambiente. Al completamento della reazione come determinate mediante TLC, la miscela di reazione è stata versata su acqua ghiacciata (700 mL), agitata per 30 minuti e il solido precipitato è stato raccolto mediante filtrazione, lavato con acqua (500 mL) ed essiccato all'aria. Il solido ottenuto è stato agitato con acetonitrile (75mL X 2), filtrato ed essiccato all'aria. Il solido ottenuto è stato nuovamente agitato con 5% MeOH in DCM (100mL), filtrato ed essiccato completamente sotto vuoto per dare il composto del titolo come un solido (14 g, 74 %). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 11.47 (s, 1H), 8.23 (t, 1H), 7.30 (s, 1H), 7.08 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.23 (d, 2H, J=4.4 Hz), 3.81 (d, 2H, J=10.4 Hz), 3.20-3.26 (m, 2H), 3.00-3.07 (m, 1H), 2.91-2.96 (m, 2H), 2.18 (s, 3H), 2.14 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.58-1.60 (m, 2H), 1.45-1.50 (m, 2H), 0.78 (t, 3H, J=6.8 Hz).

Passaggio 7: Sintesi di N-((4,6-dimetil-2-ossso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetraidro-2H-piran-4-il)ammino)-4-metil-4'-(morfolino metil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide

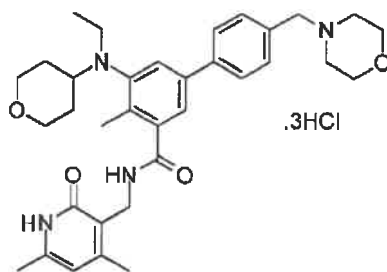


A una soluzione agitata di 5-bromo-N-((4,6-dimetil-2-ossso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-3-(etil(tetraidro-2H-piran-4-il)ammino)-2-metil

Marco Giovanni Mari  
 USBM - GPI-090

benzamide (14 g, 29.5 mmol) in miscela diossano/acqua (70 mL/14 mL) è stato aggiunto 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il) benzil) morfolino (13.4 g, 44.2 mmol) seguito dall'aggiunzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (11.2 g, 106.1 mmol). La soluzione è stata purificata con argo per 15 minuti e quindi Pd (PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (3.40 g, 2.94 mmol) è stato aggiunto e la soluzione è stata nuovamente purificata con argo per ulteriori 10 minuti. La miscela di reazione è stata scaldata a 100°C per 4 ore. Dopo completamento (monitorato mediante TLC), la miscela di reazione è stata diluita con acqua ed estratta con 10% MeOH/DCM. Gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta. Il composto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (gel di silice 100-200 maglie) eluendo con metanolo:DCM per dare il composto del titolo come un solido (12 g, 71 %). **Dati Analitici:** LCMS: 573.35 (M + 1)<sup>+</sup>; HPLC: 99.5% (@ 254 nm) (R<sub>t</sub>:3.999; **Procedimento:** Colonna: YMC ODS-A 150 mm x 4.6 mm x 5 μ; Fase Mobile: A; 0.05% TFA in acqua/ B; 0.05% TFA in acetonitrile; Vol. Iniezione: 10 μL, Col. Temp.: 30 °C; Velocità di flusso: 1.4 mL/min.; Gradiente: 5% B a 95% B in 8 min, Tenere per 1.5 min, 9.51-12 min 5% B); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 11.46 (s, 1H), 8.19 (t, 1H), 7.57 (d, 2H, J=7.2 Hz), 7.36-7.39 (m, 3H), 7.21 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.28 (d, 2H, J=2.8 Hz), 3.82 (d, 2H, J=9.6 Hz), 3.57 (bs, 4H), 3.48 (s, 2H), 3.24 (t, 2H, J=10.8Hz), 3.07-3.09 (m, 2H), 3.01 (m, 1H), 2.36 (m, 4H), 2.24 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.64-1.67 (m, 2H), 1.51-1.53 (m, 2H), 0.83 (t, 3H, J=6.4 Hz).

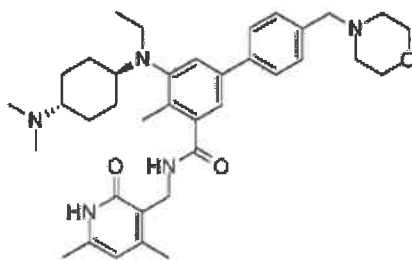
Passaggio 8: Sintesi di N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-5-(etil(tetraidro-2H-piran-4-il)ammino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide triclorigrato



N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-5-(etil (tetraidro-2H-piran-4-il)ammino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide (12 g, 21.0 mmol) è stato sciolto in HCl metanolico (200 mL) e agitato a temperatura ambiente per 3 ore. Dopo tre ore di agitazione, la miscela di reazione è stata concentrata in pressione ridotta. Il solido ottenuto è stato agitato con etere (100mL X 2) per dare il sale desiderato come un solido (11 g, 77 %). **Dati Analitici del sale tri-HCl:** LCMS: 573.40 (M + 1)<sup>+</sup>; HPLC: 99.1% (@ 254 nm) (R<sub>t</sub>:3.961; **Procedimento:** Colonna: YMC ODS-A 150 mm x 4.6 mm x 5 μ; Fase Mobile: A; 0.05% TFA in acqua/ B; 0.05% TFA in acetonitrile; Vol. Iniezione: 10 μL, Col. Temp.: 30 °C; Velocità di flusso: 1.4 mL/min.; Gradiente: 5% B a 95% B in 8 min, Tenere per 1.5 min, 9.51-12 min 5% B); <sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O 400

MHz)  $\delta$  7.92 (bs, 1H), 7.80 (s, 1H), 7.77 (d, 2H, J=8 Hz), 7.63 (s, 1H), 7.61 (s, 1H), 6.30 (s, 1H), 4.48 (s, 2H), 4.42 (s, 2H), 4.09-4.11 (m, 4H), 3.95-3.97 (m, 2H), 3.77 (t, 3H, J=10.4 Hz), 3.44-3.47 (m, 3H), 3.24-3.32 (m, 3H), 2.42 (s, 3H), 2.35 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.01 (m, 2H), 1.76 (m, 2H), 1.04 (t, 3H, J=6.8 Hz).

Esempio di Riferimento 6: N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-5-(((1r,4r)-4-(dimetilammino)cicloesil)(etil)ammino)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide



Composto E

Passaggio 1: acido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico

A una soluzione agitata di acido 2-metil-3-nitrobenzoico (100 g, 552.48 mmol) in H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrato (400 mL), 1,3-dibromo-5,5-dimetil-2,4-imidazolidinedione (87.98 g, 307.70 mmol) è stato aggiunto a porzioni a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi agitata a temperatura ambiente per 5 ore. La miscela di reazione è stata versata in acqua ghiacciata, il solido precipitato raccolto mediante filtrazione, lavato con acqua ed essiccato sotto vuoto per dare l'acido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico desiderato come un solido bianco sporco (140 g, 97.90% resa).  
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.31 (s, 1H), 8.17 (s, 1H), 2.43 (s, 3H).

Passaggio 2: metil 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoato

A una soluzione agitata di acido 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoico (285 g, 1104.65 mmol) in DMF (2.8L) è stato aggiunto sodio carbonato (468 g, 4415.09 mmol) seguito da addizione di metil ioduro (626.63 g, 4415 mmol) a temperatura ambiente. La miscela di reazione risultante è stata agitata a 60 °C per 8 h. La miscela di reazione è stata quindi filtrata per rimuovere i solidi sospesi che sono stati lavati bene con etil acetato (3 x 1 L). I filtrati combinati sono stati lavati bene con acqua (5 x 3 L) e la fase acquosa riestratta con etil acetato (3 x 1 L). Gli strati organici combinati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta per dare metil 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoato come un solido bianco sporco (290g, 97% resa).  
<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.17 (s, 1H), 7.91 (s, 1H), 3.96 (s, 3H), 2.59 (s, 3H).

Passaggio 3: metil 3-ammino-5-bromo-2-metilbenzoato

Marco Giovanni Mari  
USBM/CPI-090

A una soluzione agitata di metil 5-bromo-2-metil-3-nitrobenzoato (290 g, 1058.39 mmol) in etanolo (1.5 L) è stato aggiunto ammonio cloruro acquoso (283 g, 5290 mmol) sciolto in 1.5 L di water). La miscela risultante è stata agitata e scaldata a 80 °C seguito da addizione di polvere di ferro (472 g, 8451 mmol) in porzioni a 80 °C. La miscela di reazione risultante è stata scaldata a 80 °C per 12 ore. La miscela di reazione è stata quindi filtrata a caldo attraverso Celite® e il letto di Celite® lavato bene in metanolo (5 L) e quindi con 30% MeOH in DCM (5 L). I filtri combinati sono stati concentrate sotto vuoto e il residuo ottenuto è stato diluito con bicarbonato acquoso (2 L) ed estratto con etil acetato (3 x 5 L). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro, filtrati e concentrati in pressione ridotta per dare metil 3-ammino-5-bromo-2-metilbenzoato come un solido marrone (220 g, 89.41 % resa).

Una porzione del prodotto (5 g) è stata sciolta in etanolo bollente (20mL), il residuo insolubile rimosso mediante filtrazione e il liquido madre concentrato per ottenere metil 3-ammino-5-bromo-2-metilbenzoato (3.5g, 70% resa) con purezza in HPLC 93.81% come solido marrone chiaro. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.37 (s, 1H), 6.92 (s, 1H), 3.94 (s, 3H), 3.80 (bs, 2H), 2.31 (s, 3H).

Passaggio 4: metil 5-bromo-3-(((1r,4r)-4-((tert-butossicarbonil) ammino) cicloesil)ammino)-2-metilbenzoato

A una soluzione agitata di metil 3-ammino-5-bromo-2-metilbenzoato (5 g, 20.5 mmol) e tert-butil (4-ossocicloesil)carbamato (5.69 g, 26.7 mmol) in dicloroetano (50 mL), è stato aggiunto acido acetico (7.4 g, 123 mmol) e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 10 minuti. Sodio triacetossiboridruo (13.1 g, 61.7 mmol) è stato quindi aggiunto a 0 °C e la reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 16 ore. La reazione è stata smorzata con bicarbonato di sodio acquoso, la fase organica separata e la fase acquosa estratta con diclorometano. Gli strati organici combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna con gel di silice (dimensione della maglia 100-200) eluendo con 10% etil acetate in esano per dare 3.5 g dell'isomero (trans) più polare, metil 5-bromo-3-(((1r,4r)-4-((tert-butossicarbonil)ammino)cicloesil)ammino)-2-metilbenzoato, come solido (38.46%). <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.21 (s, 1H), 6.80 (s, 1H), 4.41 (bs, 1H), 3.85 (s, 3H), 3.60 (m, 1H), 3.45 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 2.22 (s, 3H), 2.15 (bs, 2H), 2.05 (bs, 2H), 1.45 (s, 9H), 1.30 (m, 4H).

Passaggio 5: metil 5-bromo-3-(((1r,4r)-4-((tert-butossicarbonil) ammino)cicloesil)-(etil)ammino)-2-metilbenzoato

A una soluzione agitata di metil 5-bromo-3-(((1r,4r)-4-((tert-butossicarbonil) ammino)cicloesil)(etil)ammino)-2-metilbenzoato (55 g, 0.124 mol) e acetaldeide (11 g, 0.25 mol) in dicloroetano (550 mL), è stato aggiunto acido acetico (44.64 g, 0.744 mol) e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 10 minuti. Sodio triacetossiboridruo (79 g, 0.372 mol) è stato quindi aggiunto a 0 °C e la miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 16 ore. La reazione è stata smorzata con bicarbonato di sodio acquoso, la fase organica separata

e la fase acquosa estratta con diclorometano. Gli estratti combinati sono stati essiccati su sodio solfato anidro e concentrati sotto vuoto. Il composto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna su gel di silice (dimensione maglie 100-200) eluendo con 10% etil acetato in esano per dare 44 g di metil 5-bromo-3-(((1r,4r)-4-((tert-butossicarbonil)ammino)cicloesil)-(etil)ammino)-2-metil benzoato (75.2%) come un solido. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 7.55 (s, 1H), 7.45 (s, 1H), 6.65 (d, 1H), 3.80 (s, 3H), 3.15 (bs, 1H), 3.05 (q, 2H), 2.60 (m, 1H), 2.30 (s, 3H), 1.75 (m, 4H), 1.40 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.10 (m, 2H), 0.80 (t, 3H).

Passaggio 6: tert-butil (((1r,4r)-4-((5-bromo-3-(((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-2-metilfenil)(etil)ammino)cicloesil)carbammato

NaOH acquoso (3.5 g, 0.08 mol in 10 mL di H<sub>2</sub>O) è stato aggiunto a una soluzione di metil 5-bromo-3-(((1r,4r)-4-((tert-butossicarbonil)ammino)cicloesil)-(etil)ammino)-2-metilbenzoato (25 g, 0.053 mol) in EtOH (100 mL) e agitato a 60 °C per 1 ora. L'etanolo è stato quindi rimosso in pressione ridotta e acidificato a pH 8 con HCl diluito e a pH 6 con acido citrico. La miscela è stata estratta con metanolo 10% in DCM (3 x 200 mL). Gli strati organici combinati sono stati essiccati e concentrate dando il rispettivo acido (24.2 g, 99.0 %). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 13.13 (s, 1H), 7.54 (s, 1H), 7.43 (s, 1H), 6.68 (d, 1H), 3.14 (bs, 1H), 3.03 (q, 2H), 2.56 (m, 1H), 2.33 (s, 3H), 1.80-1.65 (m, 4H), 1.40 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.10 (m, 2H), 0.77 (t, 3H).

L'acido (24 g, 0.053 mol) è stato sciolto in DMSO (100 mL) e 3-(amminometil)-4,6-dimetilpiridin-2(1H)-one (16 g, 0.106 mol) e trietilammina (5.3 g, 0.053 mol) è stata aggiunta. La miscela di reazione è stata agitata a temperatura ambiente per 15 minuti prima che PyBop (41 g, 0.079 mmol) fosse aggiunto e l'agitazione è stata quindi continuata per tutta la notte a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata versata in acqua ghiacciata (1L). Il precipitato risultante è stato raccolto mediante filtrazione, lavato bene con acqua (2 x 1L) ed essiccato. Il prodotto ottenuto è stato ulteriormente purificato mediante lavaggi con acetonitrile (3 x 200 mL) e DCM (100 mL) per dare tert-butil (((1r,4r)-4-((5-bromo-3-(((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil) carbamoil)-2-metilfenil)(etil)ammino)cicloesil)-carbammato (24 g, 77 %). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 11.47 (s, 1H), 8.24 (t, 1H), 7.25 (s, 1H), 7.04 (s, 1H), 6.67 (d, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.24 (d, 2H), 3.13 (bs, 1H), 3.01 (q, 2H), 2.53 (m, 1H), 2.18 (s, 3H), 2.10 (s, 6H), 1.80-1.65 (m, 4H), 1.40 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.10 (m, 2H), 0.77 (t, 3H).

Passaggio 7: tert-butil (((1r,4r)-4-((5-(((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)(etil)ammino)cicloesil)carbammato

A una soluzione agitata di tert-butil (((1r,4r)-4-((5-bromo-3-(((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-2-metilfenil)(etil) ammino)cicloesil)-carbammato (24 g, 0.041 mol) e 4-(4-(4,4,5,5-tetrametil-1,3,2-diossaborolan-2-il)benzil)morfolino (18 g, 0.061

mol) in una miscela diossano/acqua (160 mL + 40 mL), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (15 g, 0.15 mol) è stato aggiunto e la soluzione è stata purificata con argo per 15 minuti. Pd(PPh<sub>3</sub>)<sub>4</sub> (4.7 g, 0.041 mol) è stato quindi aggiunto e la miscela di reazione è stata di nuovo purificata con argo per 10 minuti. La miscela di reazione è stata scaldata a 100 °C per 4 ore. La miscela di reazione è stata quindi diluita con 10% MeOH/ DCM (500 mL) e filtrata. Il filtrato è stato concentrato, diluito con acqua (500 mL) ed estratto con 10% MeOH in DCM (3 x 500mL). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente rimosso in pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna su gel di silice (100-200 maglie) eluendo con 7% MeOH in DCM per dare tert-butil ((1r,4r)-4-((5-(((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)(etil)ammino) cicloesil)carbamato (20 g, 71.43 %). <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 11.46 (s, 1H), 8.20 (t, 1H), 7.56 (d, 2H), 7.36 (m, 3H), 7.17 (s, 1H), 6.66 (d, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.28 (d, 2H), 3.57 (bs, 4H), 3.48 (s, 2H), 3.20-3.05 (m, 3H), 2.62 (m, 1H), 2.36 (bs, 4H), 2.20 (s, 6H), 2.10 (s, 3H), 1.75 (m, 4H), 1.42 (m, 2H), 1.35 (s, 9H), 1.10 (m, 2H), 0.82 (t, 3H).

Passaggio 8: 5-(((1r,4r)-4-amminocicloesil)(etil)ammino)-N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide

A una soluzione agitata di tert-butil ((1r,4r)-4-((5-(((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)carbamoil)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-il)(etil)ammino)cicloesil)carbamato (20 g, 0.03 mol) in DCM (200 mL) a 0 °C, TFA (75 mL) è stato aggiunto e la reazione è stata agitata per 2 ore a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata quindi concentrata a secchezza e il residuo basicato con una soluzione acquosa satura di bicarbonato (300 mL) a pH 8. La miscela è stata estratta con 20% metanolo in DCM (4 x 200 mL). Gli estratti combinati sono stati essiccati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente rimosso in pressione ridotta per dare 5-(((1r,4r)-4-amminocicloesil)(etil)ammino)-N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-4-metil-4'-(morfolino metil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide (15.5 g, 91%) che è stato usato così com'è nella reazione successiva. <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 8.18 (bs, 1H), 7.57 (d, 2H), 7.38 (m, 3H), 7.20 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.29 (d, 2H), 3.57 (bs, 4H), 3.48 (s, 2H), 3.31 (bs, 2H), 3.10 (m, 2H), 2.91 (m, 1H), 2.67 (m, 1H), 2.36 (bs, 4H), 2.21 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.10 (s, 3H), 1.90 (m, 2H), 1.83 (m, 2H), 1.45 (m, 2H), 1.23 (m, 2H), 0.83 (t, 3H).

Passaggio 9: N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-5-(((1r,4r)-4-(dimetilammino)cicloesil)(etil)ammino)-4-metil-4'-(morfolino metil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide

A una soluzione agitata di 5-(((1r,4r)-4-amminocicloesil)(etil) ammino)-N-((4,6-dimetil-2-osso-1,2-diidropiridin-3-il)metil)-4-metil-4'-(morfolinometil)-[1,1'-bifenil]-3-carbossamide (14g, 0.023 mol) in diclorometano (150 mL) è stata aggiunta una soluzione acquosa di formaldeide 35% (2.4g, 0.080 mol) a 0° C. Dopo agitazione per 20 minuti, Na(OAc)<sub>3</sub>BH (12.2 g, 0.057 mol) è stato aggiunto e l'agitazione è continuata per 2

Marco Giovanni Mari  
USBM-GPI-090

ore a 0° C. Acqua (100 mL) è stata quindi aggiunta alla miscela di reazione e la miscela estratta con 20% metanolo in DCM (3 x 200 mL). Gli estratti combinati sono stati essiccati su Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e il solvente rimosso in pressione ridotta. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna su allumina basica eluendo con 6-7% MeOH in DCM per dare il composto del titolo (10 g, 63.6%). LCMS: 614.65 (M + 1)<sup>+</sup>; HPLC: 98.88% (@ 210-370 nm) (R<sub>t</sub>;3.724; Procedimento: Colonna: YMC ODS-A 150 mm x 4.6 mm x 5 μ; Fase Mobile: A; 0.05% TFA in acqua/ B; 0.05% TFA in acetonitrile; Vol. Iniez.: 10 μL, Col. Temp.: 30 °C; Velocità di flusso: 1.4 mL/min.; Gradiente: 5% B a 95% B in 8 min, Tenere per 1.5 min, 9.51-12 min 5% B); <sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz) δ 11.45 (s, 1H), 8.17 (t, 1H), 7.56 (d, 2H, J=8 Hz), 7.36 (m, 3H), 7.17 (s, 1H), 5.85 (s, 1H), 4.29 (d, 2H, J=4.4 Hz), 3.57 (bs, 4H), 3.48 (s, 2H), 3.09 (q, 2H), 2.66 (m, 1H), 2.36 (bs, 4H), 2.21 (s, 3H), 2.20 (s, 3H), 2.11 (s, 9H), 1.79 (m, 4H), 1.36 (m, 2H), 1.11 (m, 2H), 0.82 (t, 3H, J=6.4&6.8 Hz).

#### **Esempio 7: Protocollo di biosaggi e Procedimenti Generali**

##### Protocollo per Saggi con Enzima PRC2 di Tipo Selvatico e Mutante

**Materiali Generali.** S-adenosilmetionina (SAM), S-adenosilomociteina (SAH), bicina, KCl, Tween20, dimetilsolfossido (DMSO) e gelatina di pelle bovina (BSG) sono stati acquistati da Sigma-Aldrich al livello di purezza più alto possibile. Ditiotreitolo (DTT) è stato acquistato da EMD. <sup>3</sup>H-SAM è stato acquistato da American Radiolabeled Chemicals con un'attività specifica di 80 Ci/mmol. Piastre Flash a 384 pozzetti con streptavidina sono state acquistate dalla PerkinElmer.

**Substrati.** Peptidi rappresentativi dei residui 21-44 dell'istone H3 umano convenienti o una lisina non modificata 27 (H3K27me0) o lisina dimetilata 27 (H3K27me2) sono stati sintetizzati con un motivo linker-etichetta di affinità C-terminale G(K-biotina) e un cappuccio amidico C-terminale dalla 21<sup>st</sup> Century Biochemicals. I peptidi sono stati purificati mediante cromatografia liquida ad alte prestazioni (HPLC) a una purezza maggiore del 95% e confermati mediante cromatografia liquida spettrometria di massa (LC-MS). Le sequenze sono elencate sotto.

H3K27me0: ATKAARKSAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotina)-amide (SEQ ID NO: 13)

H3K27me2: ATKAARK(me2)SAPATGGVKKPHRYRPGGK(biotina)-amide (SEQ ID NO: 14)

Oligonucleosomi di eritrociti di pollo sono stati purificati da sangue di pollo secondo le procedure consolidate.

**Complessi PRC2 Ricombinanti.** I complessi PRC2 umani sono stati purificati come complessi a 4 elementi enzimatici co-espressi in cellule di *Spodoptera frugiperda* (sf9) usando un sistema di espressione di baculovirus. Le subunità espresso erano EZH2 di tipo selvatico (NM\_004456) o mutanti di EZH2 Y641F, N, H, S o C generati dal costrutto di EZH2 di tipo selvatico, EED (NM\_003797), Suz12 (NM\_015355) e RbAp48 (NM\_005610). La subunità EED conteneva un'etichetta FLAG N-terminale che è stata usata per purificare l'intero complesso a 4

Marco Giovanni Mari  
USRM GPI-090

componenti dai lisati di cellule sf9. La purezza dei complessi raggiungeva o superava il 95% come determinato mediante SDS-PAGE e analisi con Agilent Bioanalyzer. Le concentrazioni delle soluzioni madre degli enzimi (generalmente 0.3 - 1.0 mg/mL) è stata determinata usando un saggio Bradford contro uno standard di siero albumina bovina (BSA).

**Procedura Generale per Saggi Enzimatici PRC2 su Substrati Peptidici.** I saggi sono stati tutti eseguiti in un tampone che consisteva di bicina 20 mM (pH = 7.6), 0.5 mM DTT, 0.005% BSG e 0.002% Tween20, preparato il giorno di utilizzo. I composti in 100% DMSO (1  $\mu$ L) sono stati picchiettati in piastre di polipropilene a 384 pozzetti con fondo a V (Greiner) usando un Platemate 2 X 3 equipaggiato con una testa della pipetta a 384 canali (Thermo). DMSO (1  $\mu$ L) è stato aggiunto alle colonne 11, 12, 23, 24, file A - H per il controllo del segnale massimo, e SAH, un prodotto noto e inibitore di PRC2 (1  $\mu$ L) è stato aggiunto alle colonne 11,12, 23, 24, file I - P per il controllo del segnale minimo. Un cocktail (40  $\mu$ L) contenente l'enzima PRC2 di tipo selvatico e il peptide H3K27me0 o qualsiasi degli enzimi Y641 mutanti e il peptide H3K27me2 è stato aggiunto mediante Multidrop Combi (Thermo). I composti sono stati lasciati a incubare con PRC2 per 30 minuti a 25 °C, quindi un cocktail (10  $\mu$ L) contenente una miscela di SAM non-radioattivo e H è stato aggiunto per iniziare la reazione (volume finale = 51  $\mu$ L). In tutti i casi, le concentrazioni finali erano come segue: l'enzima PRC2 di tipo selvatico o mutante era 4 nM, SAH nei pozzetti di controllo del segnale minimo era 1 mM e la concentrazione di DMSO era 1%. Le concentrazioni finali del resto dei componenti sono indicate nella Tabella 7, sotto. I saggi sono stati fermati con l'aggiunta di SAM non radioattivo (10  $\mu$ L) a una concentrazione finale di 600  $\mu$ M, che diluisce  $^3$ H-SAM a un livello in cui la sua incorporazione nel substrato peptidico non è più rivelabile. 50  $\mu$ L della reazione nella piastra a 384 pozzetti di polipropilene sono stati quindi trasferiti in una piastra Flash a 384 pozzetti e i peptidi biotinilati sono stati lasciati legare alla superficie di streptavidina per almeno 1 ora prima di essere lavati tre volte con 0.1% Tween20 in un lava piastre Biotek ELx405. Le piastre sono state quindi lette in un lettore per piastre PerkinElmer TopCount per misurare la quantità di peptide etichettato con  $^3$ H legato alla superficie della piastra Flash, misurato come disintegrazioni per minuto (dpm) o alternativamente, riportato come conte per minuto (cpm).

**Tabella 7: Concentrazioni finali di componenti per ogni variazione del saggio basata sull'identità di EZH2 (EZH2 di tipo selvatico o Y641 mutante)**

Enzima PRC2 (denotato dall'identità di EZH2)	Peptide (nM)	SAM non radioattivo (nM)	$^3$ H-SAM (nM)
Tipo selvatico	185	1800	150
Y641F	200	850	150

Marco Giovanni Mari  
 USBM - GPI-090

Enzima PRC2 (denotato dall'identità di EZH2)	Peptide (nM)	SAM non radioattivo (nM)	<sup>3</sup> H-SAM (nM)
Y641N	200	850	150
Y641H	200	1750	250
Y641S	200	1300	200
Y641C	200	3750	250

**Procedura Generale per Saggi Enzimatici PRC2 di Tipo selvatico su Substrato di Oligonucleosomi.** I saggi sono stati eseguiti in un tampone che consisteva di bicina 20 mM (pH = 7.6), 0.5 mM DTT, 0.005% BSG, 100 mM KCl e 0.002% Tween20, preparato il giorno di utilizzo. I composti in 100% DMSO (1  $\mu$ L) sono stati picchiettati in piastre di polipropilene a 384 pozzetti con fondo a V (Greiner) usando un Platemate 2 X 3 equipaggiato con una testa della pipetta a 384 canali (Thermo). DMSO (1  $\mu$ L) è stato aggiunto alle colonne 11, 12, 23, 24, file A - H per il controllo del segnale massimo, e SAH, un prodotto noto e inibitore di PRC2 (1  $\mu$ L) è stato aggiunto alle colonne 11,12, 23, 24, file I - P per il controllo del segnale minimo. Un cocktail (40  $\mu$ L) contenente l'enzima PRC2 di tipo selvatico e oligonucleosomi di eritrociti di pollo è stato aggiunto mediante Multidrop Combi (Thermo). I composti sono stati lasciati a incubare con PRC2 per 30 minuti a 25 °C, quindi un cocktail (10  $\mu$ L) contenente una miscela di SAM non-radioattivo e <sup>3</sup>H è stato aggiunto per iniziare la reazione (volume finale = 51  $\mu$ L). Le concentrazioni finali erano come segue: l'enzima PRC2 di tipo selvatico era 4 nM, SAM non radioattivo era 430 nM, <sup>3</sup>H-SAM era 120 nM, oligonucleosoma di eritrociti di pollo era 120 nM, SAH nei pozzetti di controllo del segnale minimo era 1 mM e la concentrazione di DMSO era 1%. I saggi sono stati fermati con l'aggiunta di SAM non radioattivo (10  $\mu$ L) a una concentrazione finale di 600  $\mu$ M, che diluisce <sup>3</sup>H-SAM un livello in cui la sua incorporazione nel substrato di oligonucleosoma di eritrociti di pollo non è più rivelabile. 50  $\mu$ L della reazione nella piastra a 384 pozzetti di polipropilene sono stati quindi trasferiti in una piastra Flash a 384 pozzetti e i nucleosomi di eritrociti di pollo sono stati immobilizzati alla superficie della piastra, che è stata quindi lavata tre volte con 0.1% Tween20 in un lava piastre Biotek ELx405. Le piastre sono state quindi lette in un lettore per piastre PerkinElmer TopCount per misurare la quantità di oligonucleosoma di eritrociti di pollo etichettato con <sup>3</sup>H legato alla superficie della piastra Flash, misurato come disintegrazioni per minuto (dpm) o alternativamente, riportato come conte per minuto (cpm).

#### Calcolo della % di Inibizione

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

$$\% inh = 100 - \left( \frac{dpm_{compd} - dpm_{min}}{dpm_{max} - dpm_{min}} \right) \times 100$$

Dove dpm = disintegrazioni per minuto, compd = segnale nel pozzetto di saggio, e min e max sono rispettivamente i controlli di segnale minimo e massimo.

#### Adattamento di IC<sub>50</sub> a quattro parametri

$$Y = \text{Bottom} + \frac{(\text{Top} - \text{Bottom})}{1 + \left( \frac{X}{IC_{50}} \right)^{\text{Hill Coefficient}}}$$

[“Bottom” = Parte inferiore;

“Top” = Parte superiore;

“Hill Coefficient” = Coefficiente di Hill.]

Dove top e bottom sono normalmente lasciati fluttuare, ma possono essere fissati a 100 o 0 rispettivamente in un adattamento a 3 parametri. Il coefficiente di Hill è normalmente lasciato fluttuare ma può anche essere fissato a 1 in un adattamento a 3 parametri. Y è l'inibizione % e X è la concentrazione del composto.

I valori di IC<sub>50</sub> per i saggi enzimatici con PRC2 su substrati peptidici (per es., EZH2 di tipo selvatico e Y641F) sono presentati nella Tabella 8 sotto.

#### Saggio di Metilazione di WSU-DLCL2

Le cellule in sospensione WSU-DLCL2 sono state acquistate da DSMZ (Collezione Tedesca di Microrganismi e Colture Cellulari, Braunschweig, Germania). Terreno RPMI/Glutamax, Penicillina-Streptomina, Siero Bovino Fetale Inattivato al Calore, e D-PBS sono stati acquistati da Life Technologies, Grand Island, NY, USA. Il Tampone per Estrazione e il Tampone per Neutralizzazione (5X) sono stati acquistati da Active Motif, Carlsbad, CA, USA. L'anticorpo di coniglio anti-Istone H3 è stato acquistato da Abcam, Cambridge, MA, USA. Anti-H3K27me3 di coniglio e anti-IgG di coniglio coniugato a HRP sono stati acquistati da Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA. Il substrato TMB "Super Sensibile" è stato fornito dai BioFX Laboratories, Owings Mills, MD, USA. Siero Albumina Bovina priva di IgG è stata acquistata da Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA. PBS con Tween (10X PBST) è stato acquistato da KPL, Gaithersburg, MD, USA. L'Acido Solforico è stato acquistato da Ricca Chemical, Arlington, TX, USA. Piastre per ELISA immunologico sono state acquistate da Thermo, Rochester, NY, USA. Piastre per coltura cellulare con fondo a V sono state acquistate da Corning Inc., Corning, NY, USA. Piastre in polipropilene con fondo a

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI 1090

V sono state acquistate da Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA.

Le cellule in sospensione WSU-DLCL2 sono state mantenute in terreno di crescita (RPMI 1640 integrato con 10% v/v siero bovino fetale inattivato al calore e 100 unità/mL di penicillina-streptomicina) e coltivate a 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Nelle condizioni del saggio, le cellule sono state incubate in Terreno per Saggio (RPMI 1640 integrato con 20% v/v siero bovino fetale inattivato al calore e 100 unità/mL di penicillina-streptomicina) a 37 °C in 5% CO<sub>2</sub> su un agitatore di piastre.

Le cellule WSU-DLCL2 sono state seminate in terreno per saggio a una concentrazione di 50000 cellule per mL a una piastra per coltura cellulare con fondo a V a 96 pozzetti con 200 µL per pozzetto. Il composto (1 µL) dalle piastre d'origine a 96 pozzetti è stato aggiunto direttamente alla piastra per cellule con fondo a V. Le piastre sono state incubate su un agitatore di piastre con titolo a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> per 96 ore. Dopo Quattro giorni di incubazione, le piastre sono state fatte girare a 241 x g per cinque minuti e il terreno è stato aspirato gentilmente da ogni pozzetto della piastra per cellule senza disturbare il precipitato cellulare. Il precipitato è stato risospeso in 200 µL DPBS e le piastre sono state fatte ruotare di nuovo a 241 x g per cinque minuti. Il supernatante è stato aspirato e Tampone per estrazione freddo (4°C) (100 µL) è stato aggiunto per pozzetto. Le piastre sono state incubate a 4°C su un agitatore orbitale per due ore. Le piastre sono state fatte ruotare a 3427 x g x 10 minuti. Il supernatante (80 µL per pozzetto) è stato trasferito nel rispettivo pozzetto nella piastra a 96 pozzetti di polipropilene con fondo a V. Il Tampone di Neutralizzazione 5X (20 µL per pozzetto) è stato aggiunto alla piastra di polipropilene con fondo a V contenente il supernatante. Le piastre di polipropilene con fondo a V contenenti la preparazione di istone crudo (CHP) sono state incubate su un agitatore orbitale x cinque minuti. Le Preparazioni di Istone Crudo sono state aggiunte (2µL per pozzetto) a ogni rispettivo pozzetto nelle piastre per ELISA a 96 pozzetti in duplicato contenenti 100 µL di Tampone di Rivestimento (1X PBS + BSA 0.05% p/v). Le piastre sono state sigillate e incubate per tutta la notte a 4°C. Il giorno successivo, le piastre sono state lavate tre volte con 300 µL per pozzetto 1X PBST. I pozzetti sono stati bloccati per due ore con 300 µL per pozzetto di Diluente per ELISA ((PBS (1X) BSA (2% p/v) e Tween20 (0.05% v/v)). Le piastre sono state lavate tre volte con 1X PBST. Per la piastra di rivelazione dell'Istone H3, sono stati aggiunti 100 µL per pozzetto di anticorpo anti-Istone-H3 (Abcam, ab1791) diluito 1:10000 in Diluente per ELISA. Per la piastra di rivelazione della trimetilazione di H3K27, sono stati aggiunti 100 µL per pozzetto di anti-H3K27me3 diluito 1:2000 in Diluente per ELISA. Le piastre sono state incubate per 90 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono state lavate tre volte con 300 µL 1X PBST per pozzetto. Per la rivelazione di Istone H3, 100 µL di anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con HRP diluito 1:6000 in diluente per ELISA sono stati aggiunti per pozzetto. Per la rivelazione di H3K27me3, 100 µL di anticorpo anti-IgG di coniglio coniugato con HRP diluito 1:4000 in diluente per ELISA sono stati aggiunti per pozzetto. Le piastre sono state incubate per 90 minuti a temperatura ambiente. Le piastre sono

Marco Giovanni Mari  
USBAI - CPI-090

state lavate quattro volte con 300 µL 1X PBST per pozzetto. 100 µL di substrato TMB sono stati aggiunti per pozzetto. Le piastre con Istone H3 sono state incubate per cinque minuti a temperatura ambiente. Le piastre con H3K27me3 sono state incubate per 10 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata fermata con acido solforico 1N (100 µL per pozzetto). L'assorbanza per ogni piastra è stata letta a 450 nm.

Prima, è stato determinato il rapporto per ogni pozzetto con :

$$\left( \frac{\text{H3K27me3 OD450 value}}{\text{Histone H3 OD450 value}} \right)$$

[“OD450 value” = valore di OD450;

“Histone” = Istone.]

Ogni piastra includeva otto pozzetti di controllo di trattamento con solo DMSO (Inibizione Minima) come pure otto pozzetti di controllo per l'inibizione massima (Pozzetti di fondo). La media dei valori del rapporto per ogni tipo di controllo è stata calcolata e usata per determinare l'inibizione percentuale per ogni pozzetto d'esame nella piastra. Il composto in esame era diluito in serie tre volte in DMSO per un totale di dieci concentrazioni in esame, iniziando a 25 µM. E' stata determinata l'inibizione percentuale e le curve di IC<sub>50</sub> sono state generate usando i pozzetti in duplicato per la concentrazione del composto. I valori di IC<sub>50</sub> per questo saggio sono presentati nella Tabella 8 sotto.

Inibizione Percentuale = 100-

$$\left( \left( \frac{(\text{Individual Test Sample Ratio}) - (\text{Background Avg Ratio})}{(\text{Minimum Inhibition Ratio}) - (\text{Background Average Ratio})} \right) * 100 \right)$$

[“Individual Test Sample Ratio” = Rapporto del Campione in Esame Individuale;

“Background Avg Ratio” = Rapporto Medio di Fondo;

“Minimum Inhibition Ratio” = Rapporto di Inibizione Minimo;

“Background Average Ratio” = Rapporto Medio di Fondo.]

### **Analisi della proliferazione cellulare**

Le cellule in sospensione WSU-DLCL2 sono state acquistate da DSMZ (Collezione Tedesca di Microrganismi e Colture Cellulari, Braunschweig, Germania). Terreno RPMI/Glutamax, Penicillina-Streptomicina, Siero Bovino Fetale Inattivato al Calore sono stati acquistati da Life Technologies, Grand Island, NY, USA. Piastre in polipropilene a 384 pozzetti con fondo a V sono state acquistate da Greiner Bio-One, Monroe, NC, USA. Piastre per coltura cellulare a 384 pozzetti bianche opache sono state acquistate da Perkin Elmer, Waltham, MA, USA. Cell-

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

Titer Glo® è stato acquistato da Promega Corporation, Madison, WI, USA. Il lettore di piastre SpectraMax M5 è stato acquistato da Molecular Devices LLC, Sunnyvale, CA, USA.

Le cellule in sospensione WSU-DLCL2 sono state mantenute in terreno di crescita (RPMI 1640 integrato con 10% v/v siero bovino fetale inattivato al calore e coltivate a 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. Nelle condizioni del saggio, le cellule sono state incubate in Terreno per Saggio (RPMI 1640 integrato con 20% v/v siero bovino fetale inattivato al calore e 100 unità/mL di penicillina-streptomina) a 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

Per l'accertamento dell'effetto dei composti sulla proliferazione della linea cellulare WSU-DLCL2, le cellule in crescita esponenziale sono state piastrate in piastre bianche opache a 384 pozzetti a una densità di 1250 cellule/ml in un volume finale di 50 µl di terreno per saggio. Una piastra d'origine del composto è stata preparata eseguendo diluizioni seriali di 3 volte in nove punti in triplicato in DMSO, iniziando a 10 mM (la concentrazione finale massima del composto nel saggio era 20 µM e DMSO era 0.2%). Un'aliquota di 100 nL dalla piastra madre del composto è stata aggiunta al suo rispettivo pozzetto nella piastra per cellule. Il controllo con 100% di inibizione consisteva in cellule trattate con una concentrazione finale di 200 nM di staurosporina e il controllo con 0% di inibizione consisteva in cellule trattate con DMSO. Dopo l'aggiunta dei composti, le piastre del saggio sono state incubate per 6 giorni a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, umidità relativa > 90% per 6 giorni. La vitalità cellulare è stata misurata mediante quantificazione dell'ATP presente nelle colture cellulari, aggiungendo 35 µl di reagente CellTiter-Glo® alle piastre per cellule. La luminescenza è stata letta nello SpectraMax M5. La concentrazione inibente la vitalità cellulare al 50% è stata determinata usando un adattamento a 4 parametri delle curve dose risposta normalizzate.

La citazione di pubblicazioni e di documenti brevettuali non è intesa come ammissione che alcuni siano tecnica precedente pertinente, né costituisce alcuna ammissione su contenuti o date della medesima. Essendo stata ora descritta l'invenzione per mezzo di una descrizione scritta, quelli esperti nella tecnica riconosceranno che l'invenzione può essere messa in pratica in una varietà di forme di attuazione e che la precedente descrizione e gli esempi sopra riportati sono a scopo illustrativo e non limitazione delle rivendicazioni che seguono.

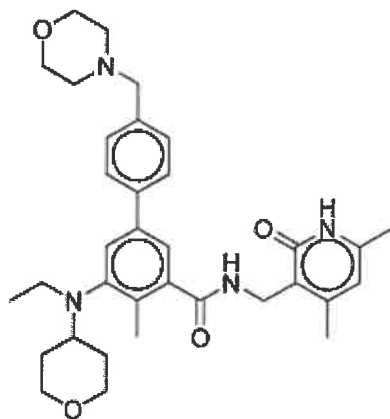
## EQUIVALENTI

L'invenzione può essere incorporata in altre forme specifiche senza allontanarsi dalle sue caratteristiche essenziali. Le precedenti forme di attuazione devono perciò essere considerate in ogni rispetto illustrative piuttosto che limitanti l'invenzione descritta qui. L'ambito dell'invenzione è pertanto indicato dalle rivendicazioni accluse piuttosto che dalla precedente descrizione.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

## RIVENDICAZIONI

1. Inibitore di EZH2 per l'uso nel trattamento di sarcoma epiteloide, in cui l'inibitore di EZH2 è:



(A) o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

2. Inibitore di EZH2 per l'uso secondo la rivendicazione 1, per trattare o alleviare un sintomo di un cancro associato al complesso SWI/SNF in un soggetto, in cui il soggetto ha un sarcoma epiteloide, in cui il soggetto è identificato per avere espressione alterata e/o perdita di funzione del complesso SWI/SNF o uno o più componenti del complesso SWI/SNF.
3. Inibitore di EZH2 per l'uso secondo la rivendicazione 2, in cui il cancro associato a SWI/SNF è caratterizzato dalla ridotta espressione o dalla perdita di funzione del complesso SWI/SNF o uno o più componenti del complesso SWI/SNF.
4. Inibitore di EZH2 per l'uso secondo la rivendicazione 3, in cui l'uno o più componenti sono scelti dal gruppo che consiste di SNF5, ATRX e ARID1A.
5. Inibitore di EZH2 per l'uso secondo la rivendicazione 3, in cui la perdita di funzione è causata da una mutazione della perdita di funzione risultante da una mutazione puntiforme, una delezione e/o un'inserzione.
6. Inibitore di EZH2 per l'uso secondo la rivendicazione 1, in cui il soggetto ha una delezione di SNF5.

\*\*\* \*\* \*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

## LEGENDA DELLE TAVOLE DI DISEGNO

### TAVOLA 1/29

“Actin” = Actina

“WT” = di tipo selvatico

“Mutant” = Mutante

### TAVOLA 2/29

“Actin” = Actina

### TAVOLA 3/29

“WT” = di tipo selvatico

“Compound” = Composto

“Cell Viability” = Vitalità Cellulare

“Days” = Giorni

### TAVOLA 4/29

“Mutant” = Mutante

“Cell Viability” = Vitalità Cellulare

“Days” = Giorni

### TAVOLA 5/29

“cells/well” = cellule/pozzetto

“Compound” = Composto

### TAVOLA 6/29

“Growth” = Crescita

“Compound” = Composto

“cells/well” = cellule/pozzetto

### TAVOLA 7/29

“WT” = di tipo selvatico

Marco Giovanni Mari  
USBN - CPF090

“Compound” = Composto

“Mutant” = Mutante

TAVOLA 8/29

“WT” = di tipo selvatico

“Mutant” = Mutante

TAVOLA 9/29

“Tumor Volume” = Volume del Tumore

“Day” = Giorno

“mice for” = topi per

“Vehicle” = Veicolo

“Days” = Giorni

“Compound” = Composto

TAVOLA 10/29

“Tumor histone methylation” = Metilazione degli istoni tumorali

“Vehicle” = Veicolo

TAVOLA 11/29

“Mutations” = Mutazioni

“Residue” = Residuo

“Mutation count” = Conta delle mutazioni

TAVOLA 12-13-14/29

“Days” = Giorni

“Cpd” = Composto

“Day” = Giorno

TAVOLA 15/29

“Day” = Giorno

Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

TAVOLA 16/29

“Compound” = Composto

“deleted” = cancellato

“naive” = mai stimolato dall’antigene

“WT” = di tipo selvatico

TAVOLA 17/29

“Luminescence” = Luminescenza

“Days” = Giorni

“Days of incubation” = Giorni di incubazione

“Cpd” = Composto

TAVOLA 18/29

“Nucleosome” = Nucleosoma

TAVOLA 19/29

“WT” = di tipo selvatico

“Deleted” = Cancellato

“Actin” = Actina

“Compound” = Composto

“acetyl” = acetile

TAVOLA 20/29

“Control Cells” = Cellule di Controllo

“positive cells” = cellule positive

“Day” = Giorno

“Mutant” = Mutante

TAVOLA 21/29

“fold basal expression compared to RD cells” = espressione basale in volte in confronto a cellule RD

  
Marco Giovanni Mari  
USBM-CPI-090

TAVOLA 22-23-24/29

“fold change of DMSO control” = cambiamento in volte del controllo con DMSO

“Day” = Giorno

TAVOLA 25/29

“Compound” = Composto

TAVOLA 26/29

“Body Weight” = Peso Corporeo

“Days” = Giorni

“Vehicle” = Veicolo

“Tumor Volume” = Volume del Tumore

TAVOLA 27/29

“Tumor Weights” = Pesi dei Tumori

“Day” = Giorno

“Vehicle” = Veicolo

“All dosed groups \*\*\*\* vs. vehicle” = Tutti i gruppi dosati \*\*\*\* vs. veicolo

“concentration” = concentrazione

“or” = o

“Plasma levels 5 min before last dose on day 21” = Livelli plasmatici 5 minuti prima dell’ultima dose il giorno 21

“Plasma levels 3 h after last dose on day 21” = Livelli plasmatici 3 ore dopo l’ultima dose il giorno 21

“Levels in tumors harvested 3 h after the last dose on day 21” = Livelli nei tumori raccolti 3 ore dopo l’ultima dose il giorno 21

TAVOLA 28/29

“Tumor volume” = Volume del Tumore

“Vehicle” = Veicolo

“Cpd” = Composto

“Days” = Giorni

Marco Giovanni Mari  
USPM, CPI-090

“All dosed groups \*\*\*\* vs. vehicle” = Tutti i gruppi dosati \*\*\*\* vs. veicolo

“Compound” = Composto

TAVOLA 29/29

“fold change vs. vehicle” = cambiamento in volte vs. veicolo

“Vehicle” = Veicolo

\*\*\* \*\*

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

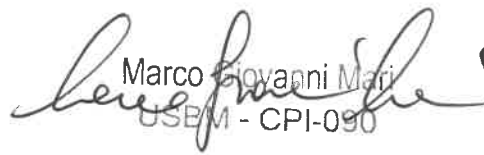
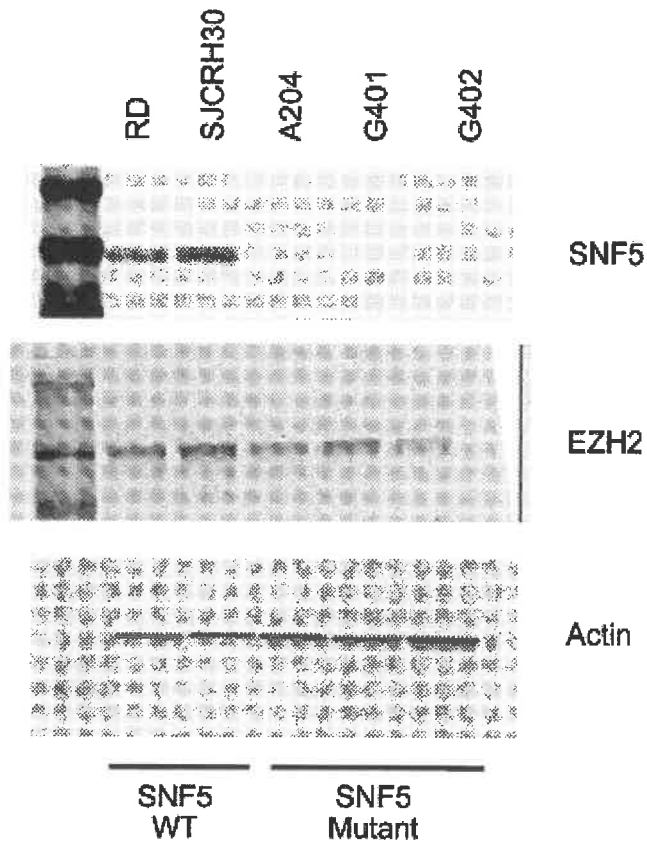
  
Marco Giovanni Mari  
USEM - CPI-090

FIG. 1A



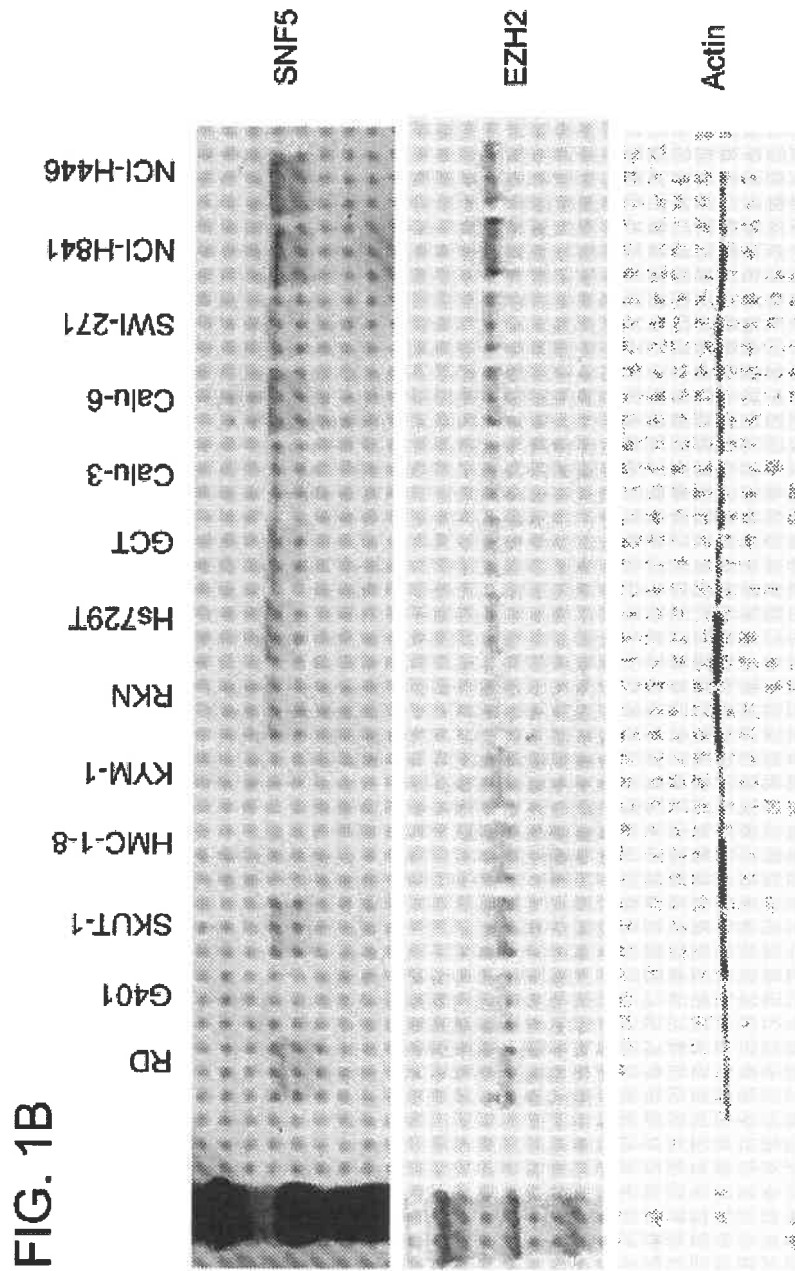


FIG. 1B

FIG. 2A

SNF5 WT

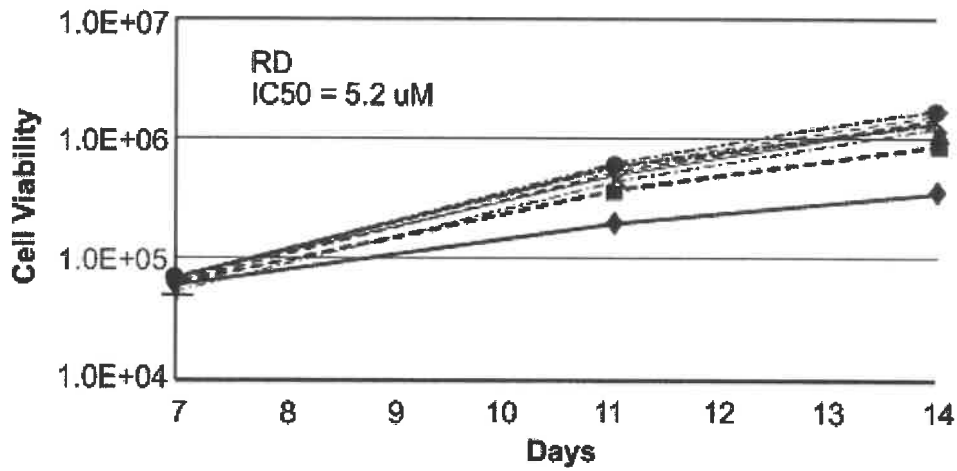
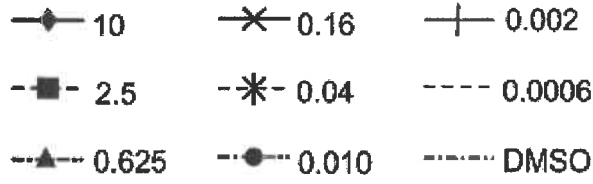
[Compound E;  $\mu\text{M}$ ]

FIG. 2B

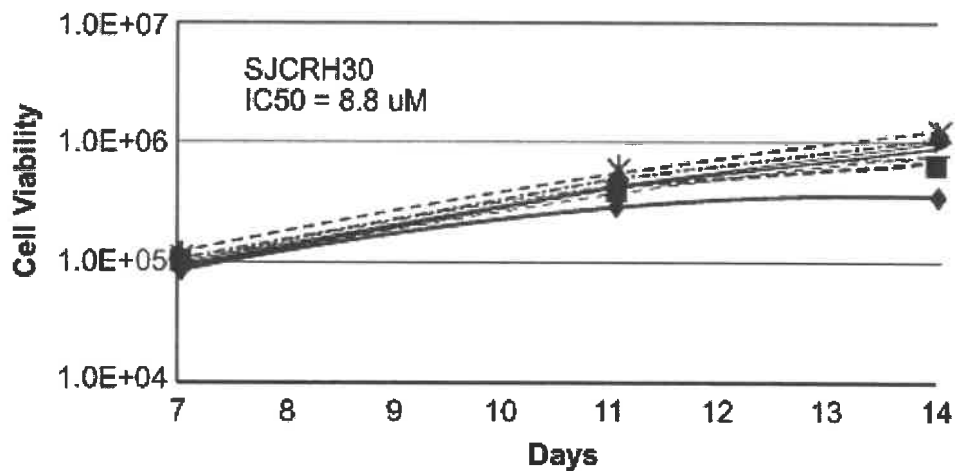


FIG. 2C

4/29

*SNF5 Mutant*

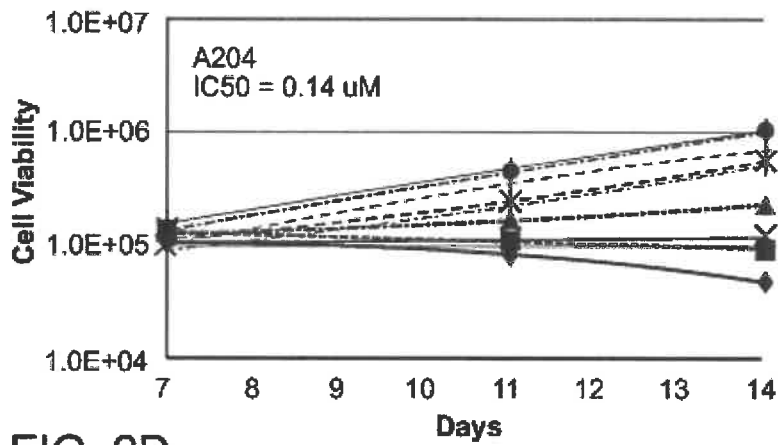


FIG. 2D

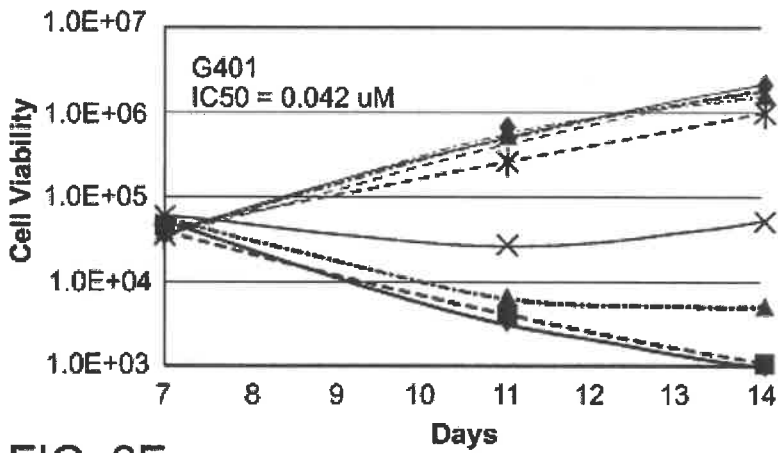
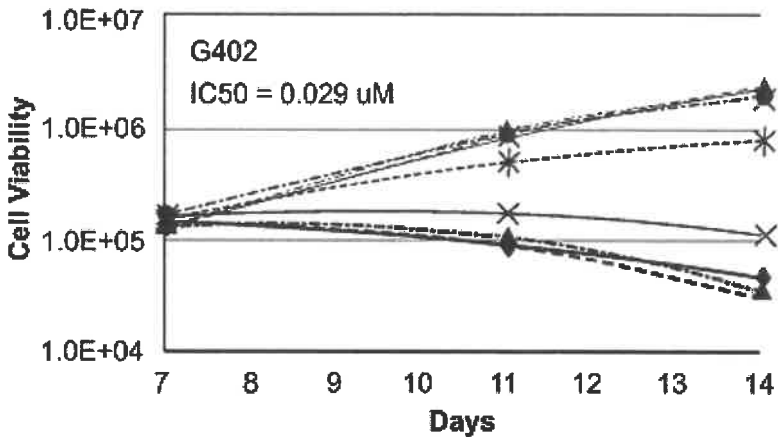


FIG. 2E



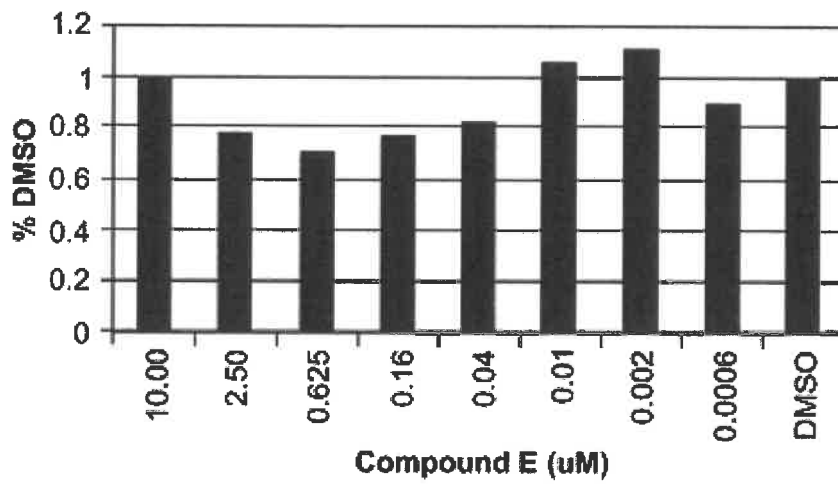
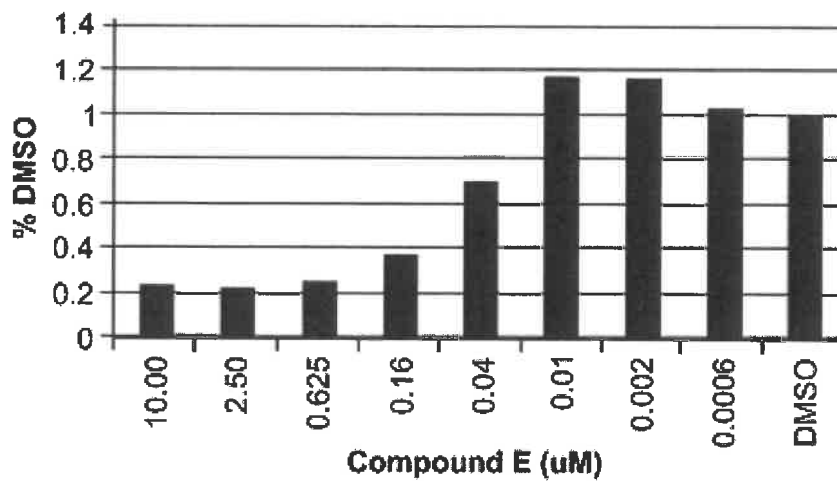
**FIG. 3A** RD (5,000 cells/well)**FIG. 3B** G401 (5,000 cells/well)

FIG. 3C

## G401 2D GROWTH

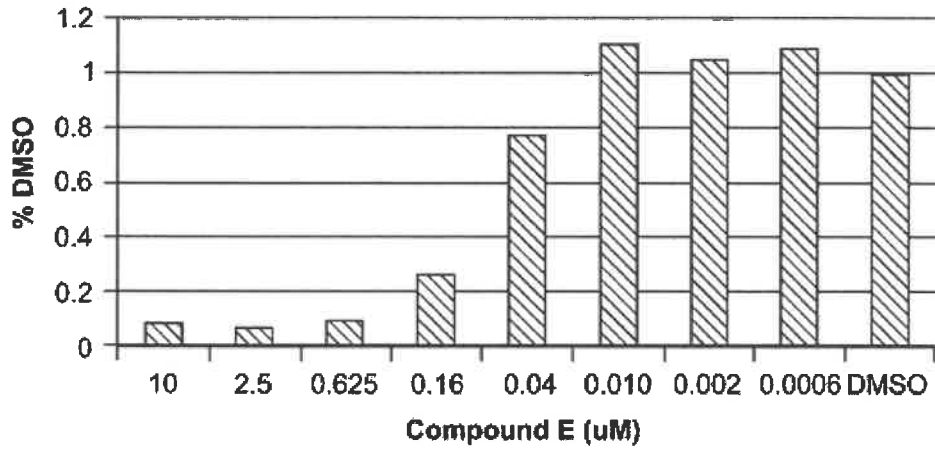


FIG. 3D

## G401 (10,000 cells/well)

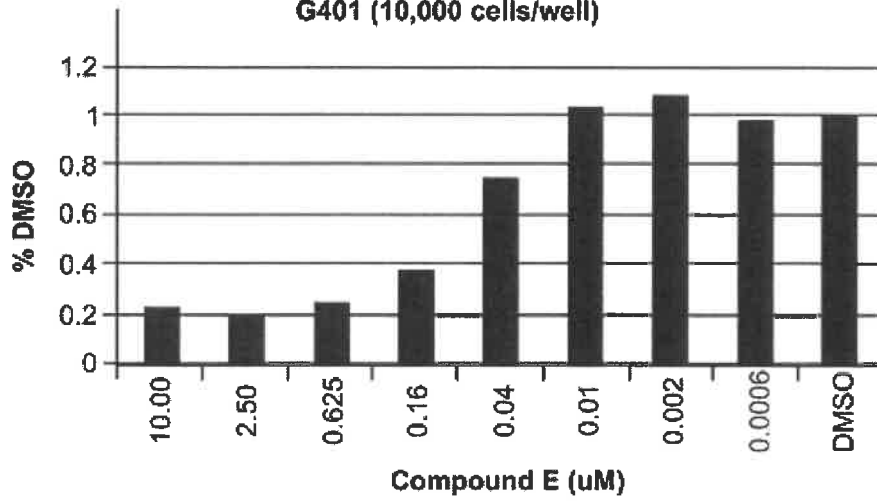


FIG. 4A

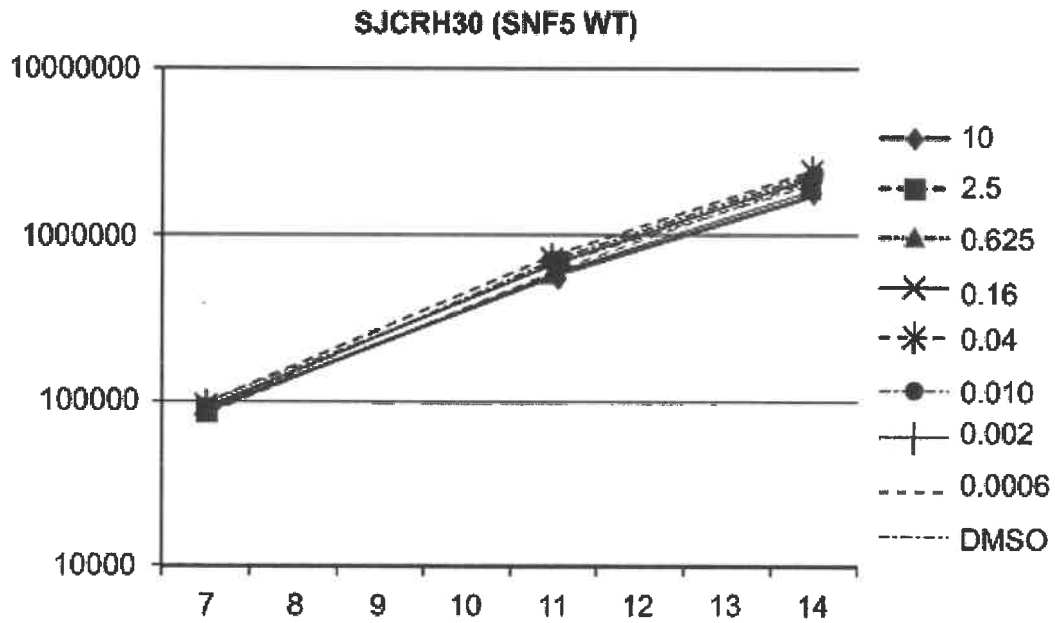


FIG. 4B

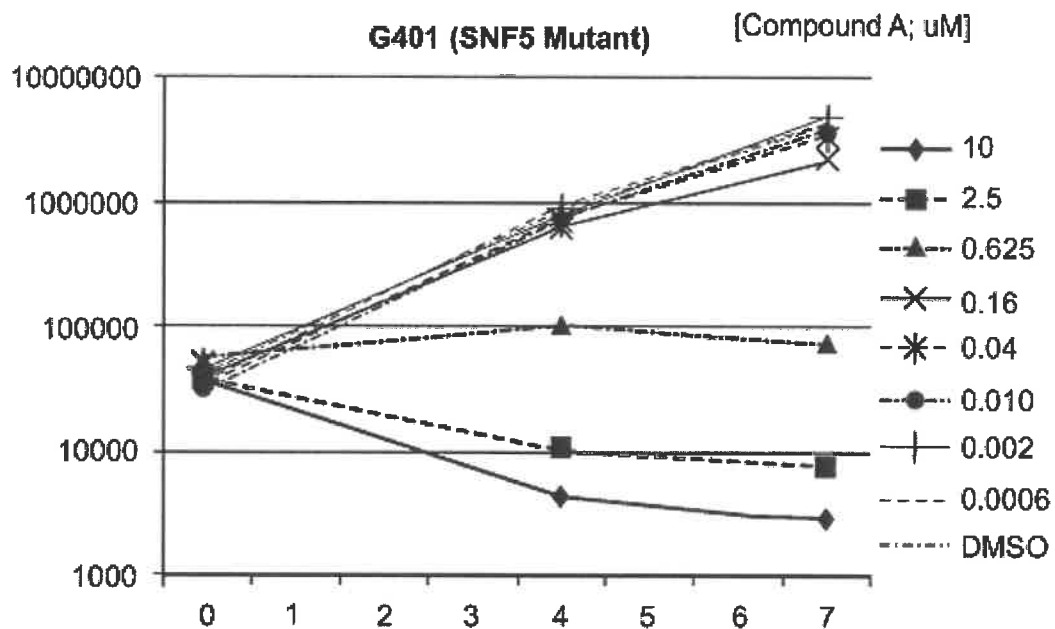


FIG. 4C

RD (SNF5 WT)

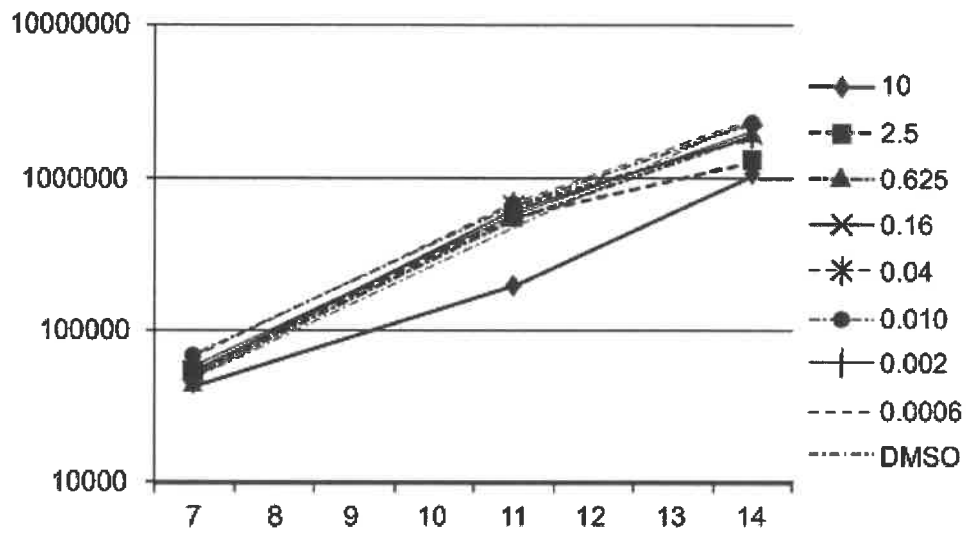


FIG. 4D

A204 (SNF5 Mutant)

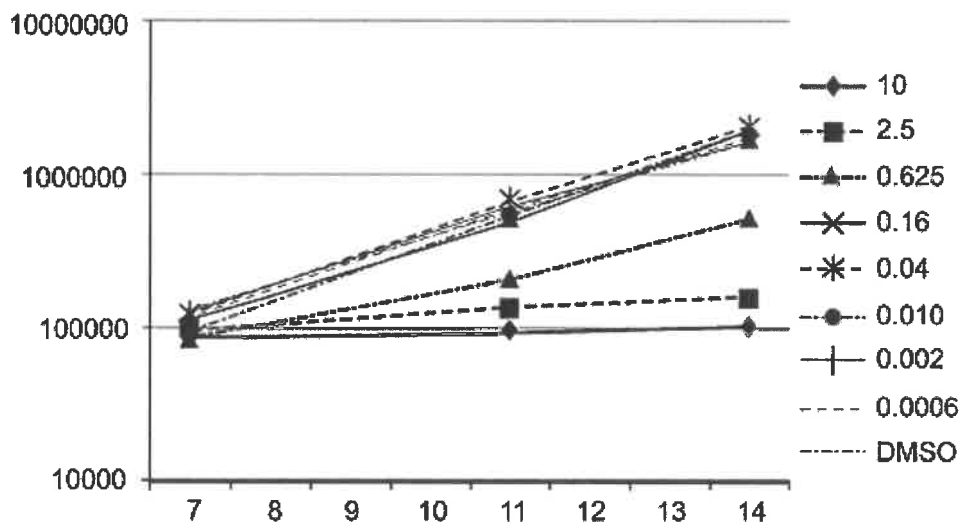


FIG. 5A

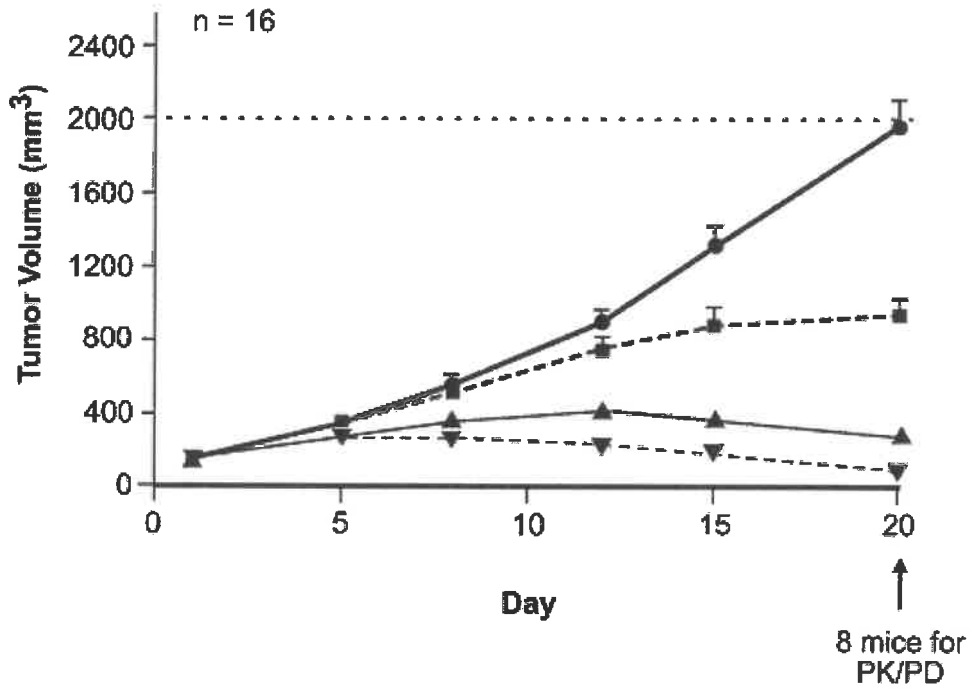
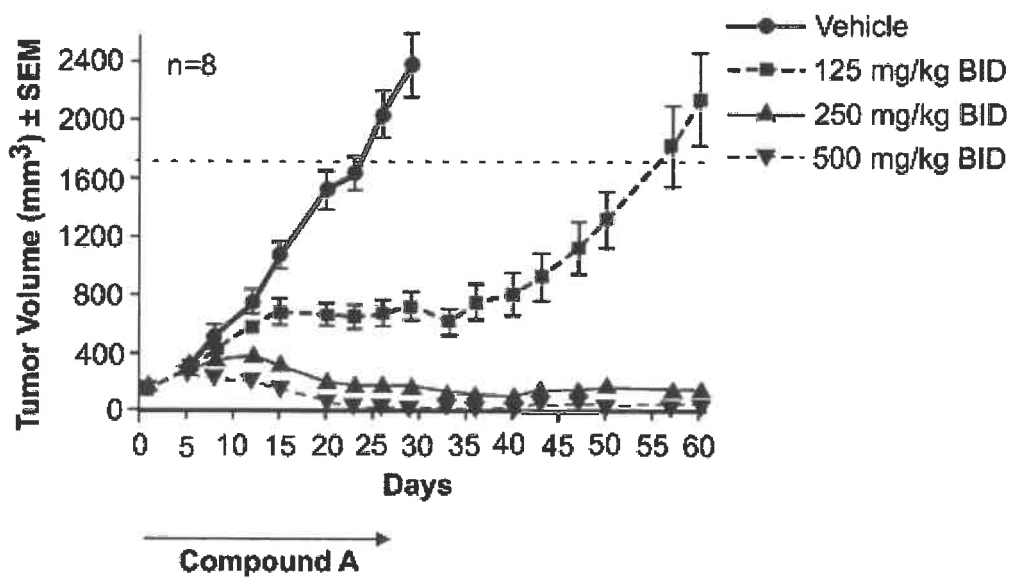


FIG. 5B



Marco Giovannini Mari  
 USBM - CPI-090

FIG. 5C

Tumor histone methylation

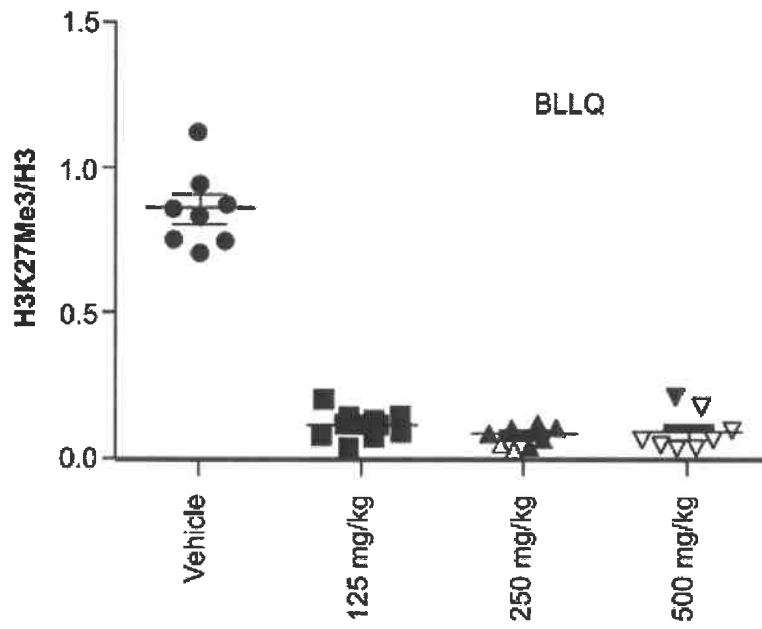


FIG. 5D

Vehicle

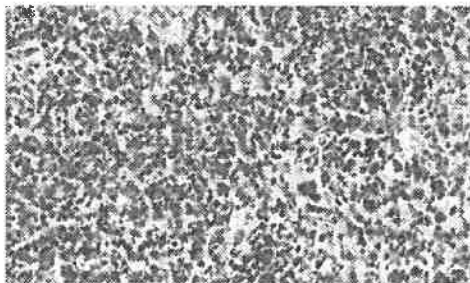


FIG. 5E

125mpk

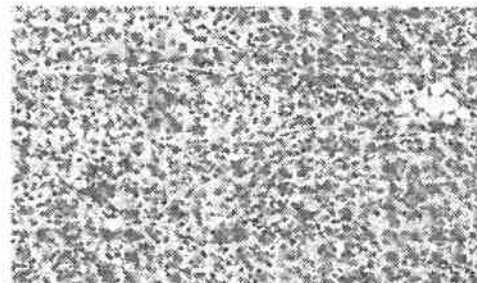
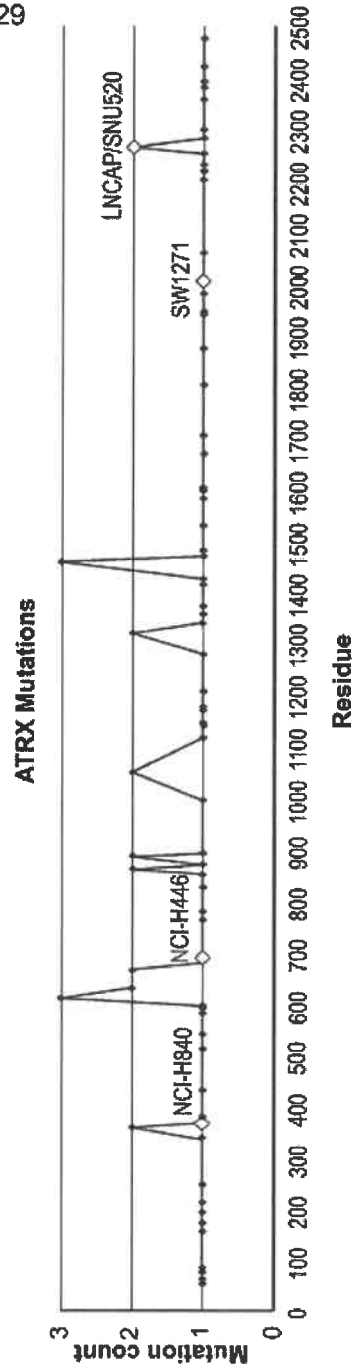
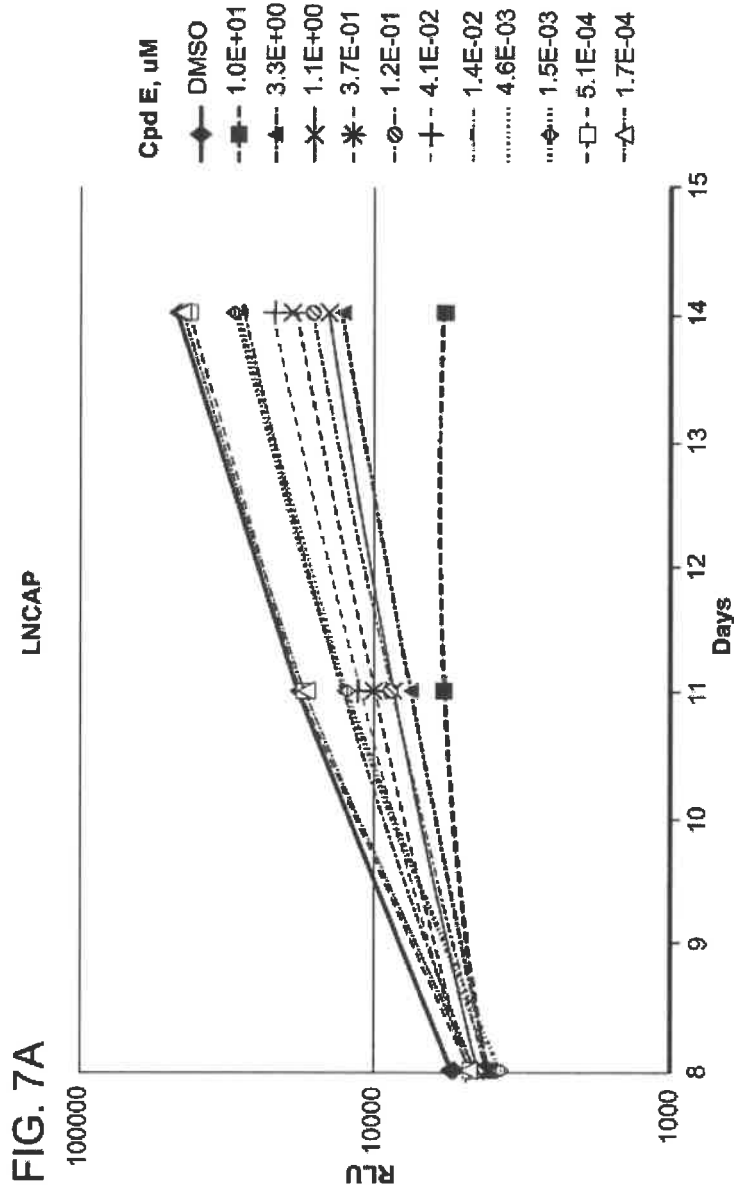


FIG. 6





**FIG. 7B**

	IC50 day 11	IC50 day 14
WSU-DLCL2	2.8 nM	ND
LNCAP	498 nM	42 nM

Marco Giovanni Mari  
 USBM-CPI-090

FIG. 8A

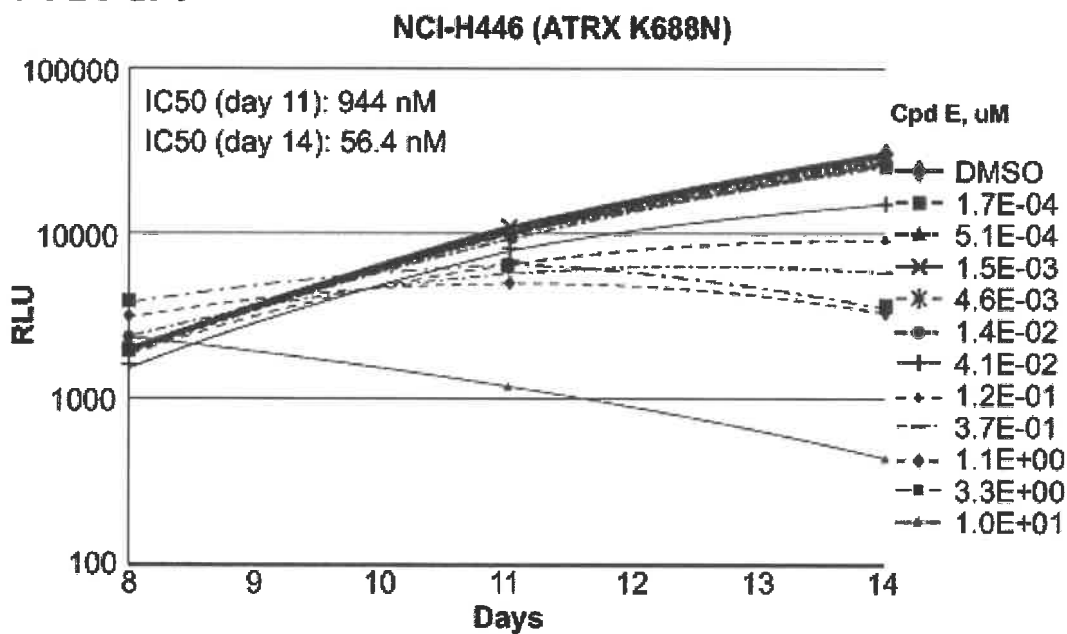
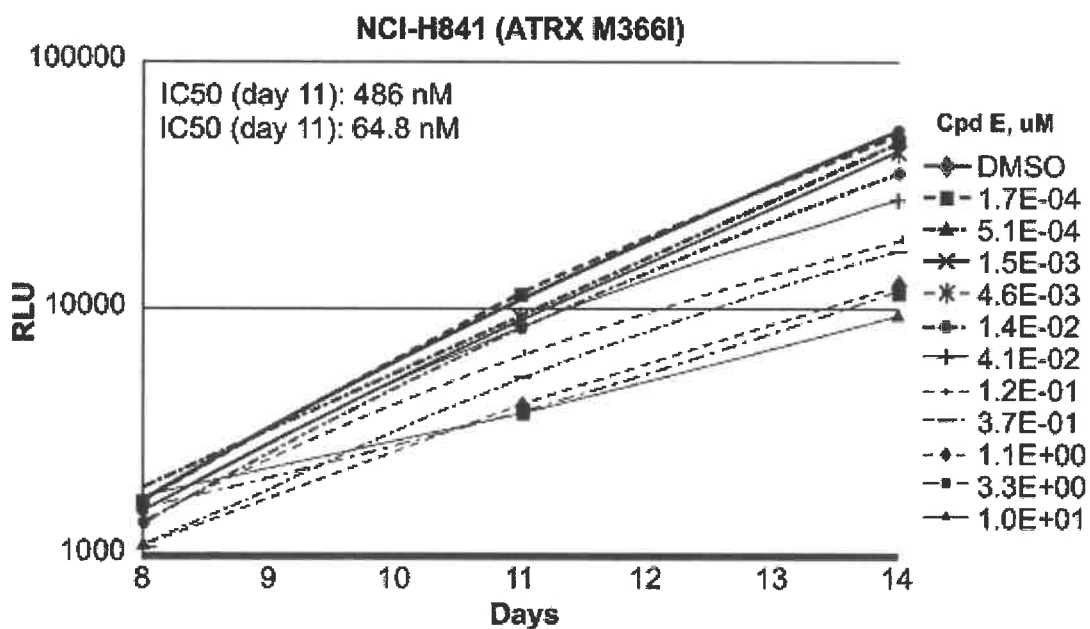
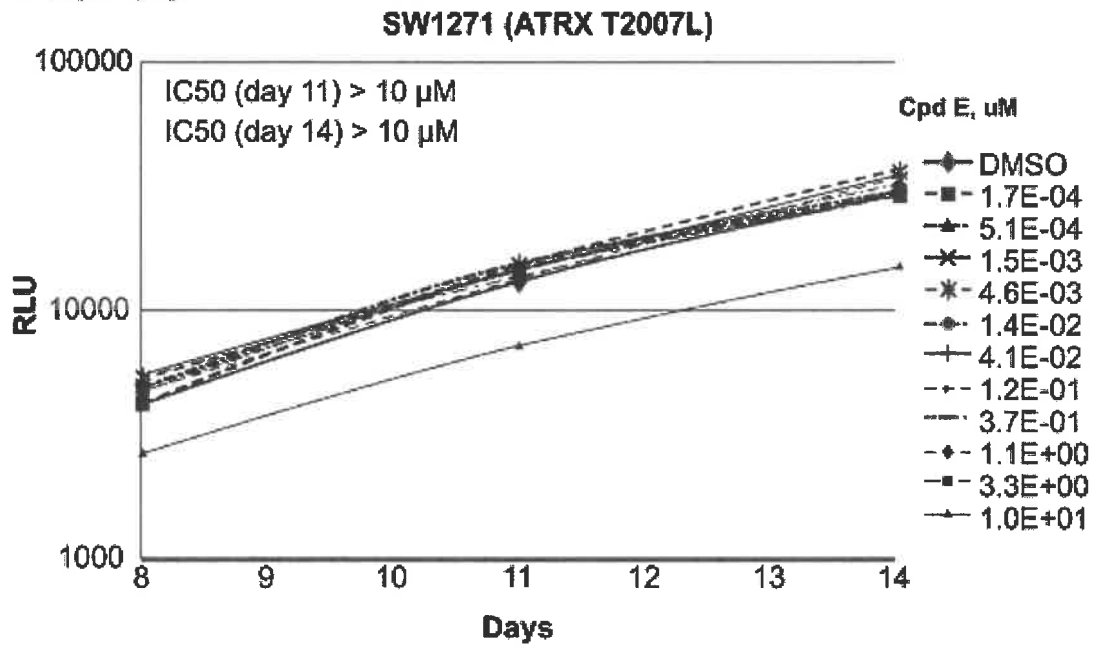


FIG. 8B



Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

FIG. 8C



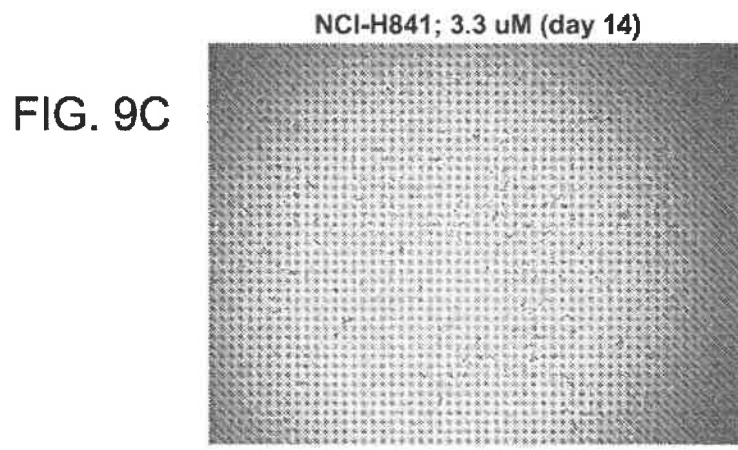
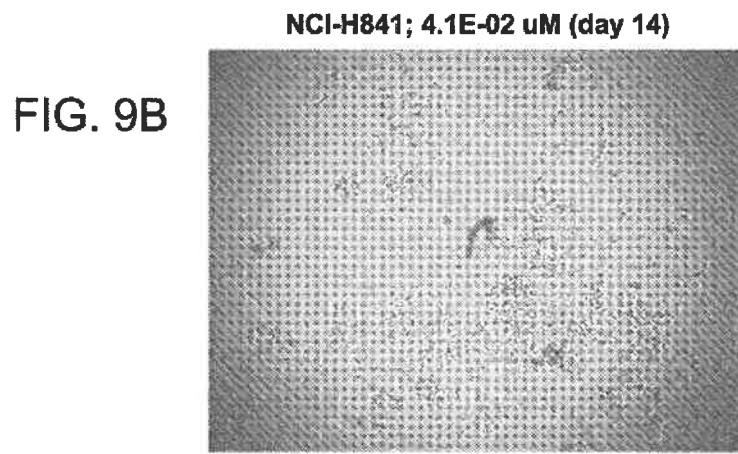
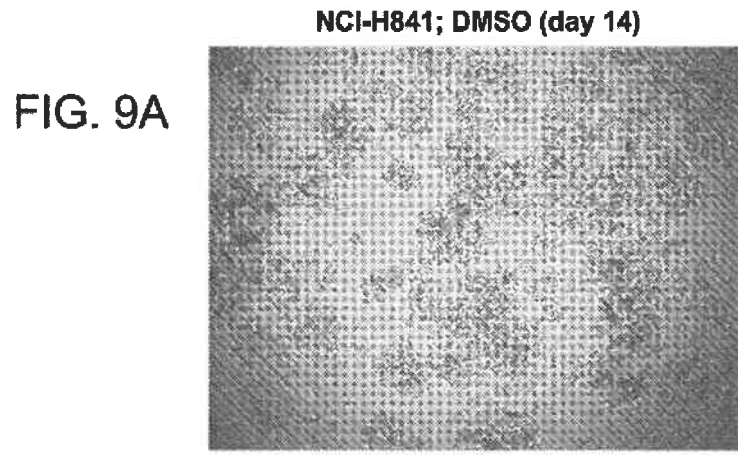


FIG. 10A

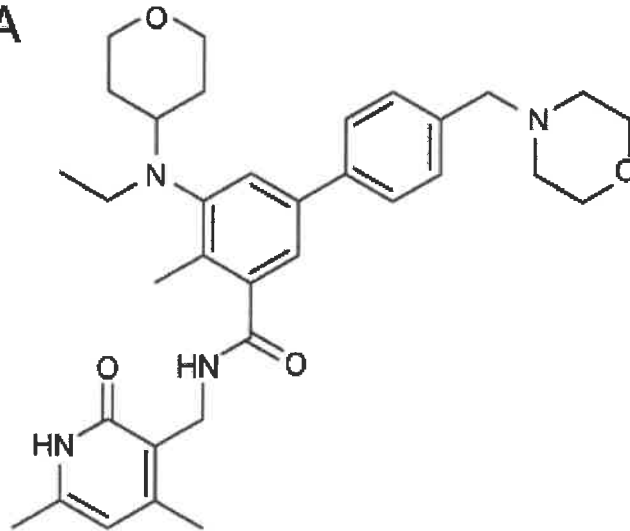


FIG. 10B

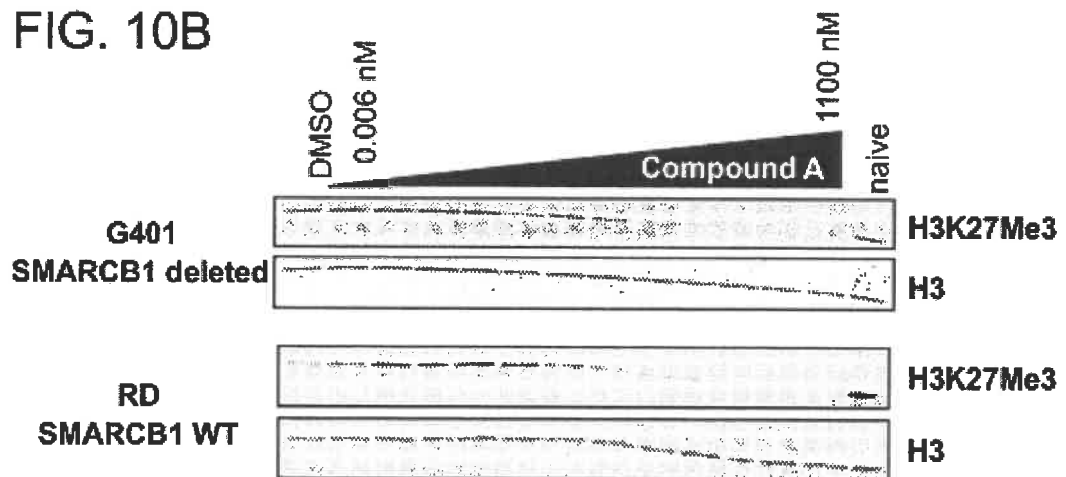


FIG. 10C-b

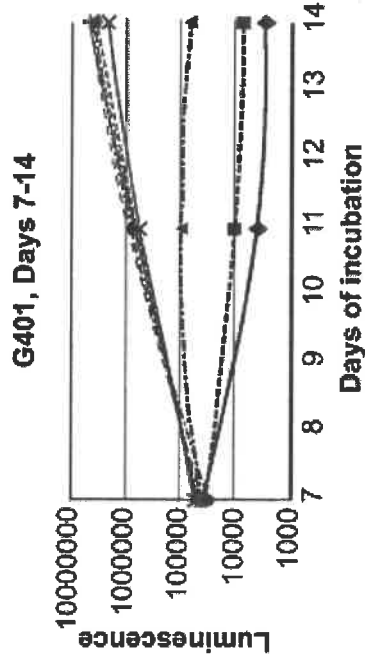


FIG. 10C-d

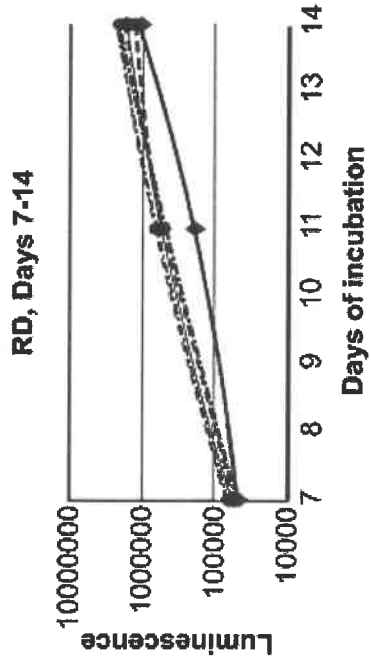


FIG. 10C-a

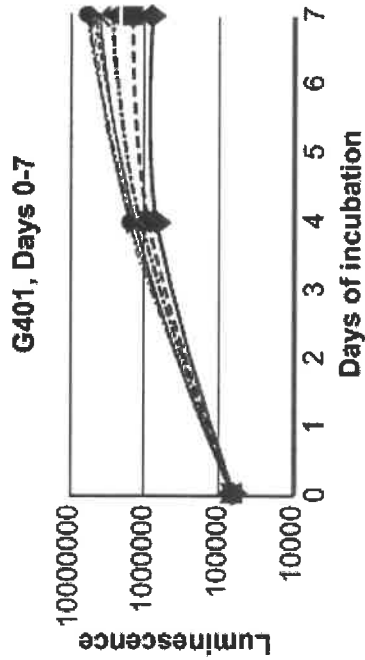
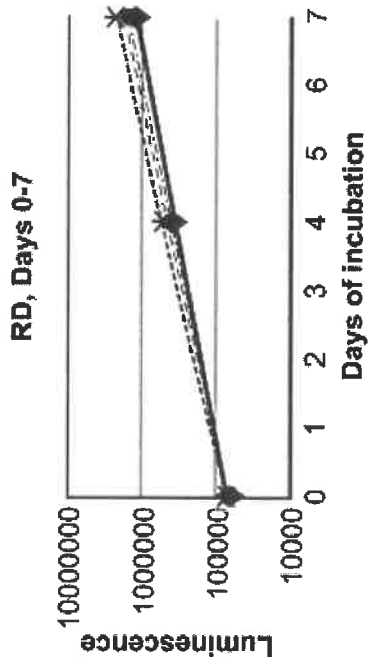


FIG. 10C-c



- $\mu\text{M}$   
Cpd A
- ◆ 10
  - 2.5
  - ▲ 0.625
  - ✕ 0.16
  - \* 0.04
  - 0.010
  - + 0.002
  - - 0.0006
  - DMSO

FIG. 11A

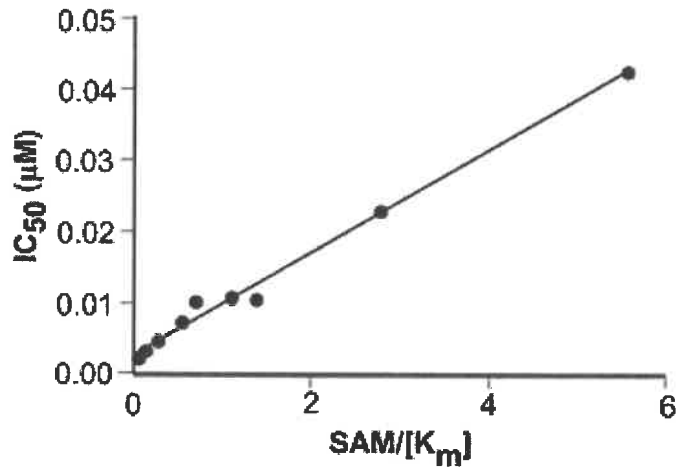
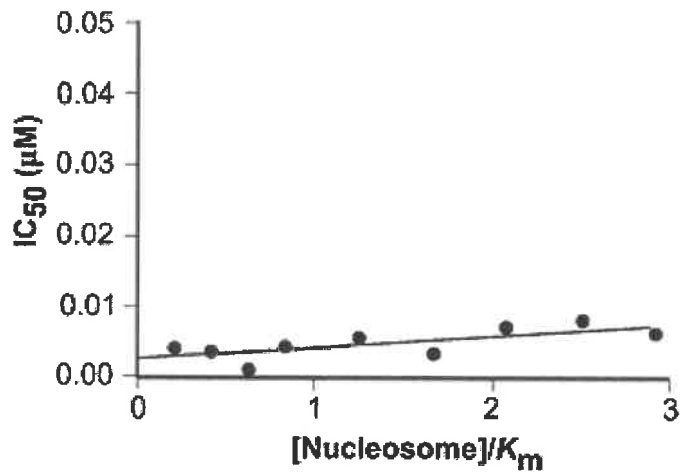


FIG. 11B



Marco Giovanni Mari  
USBM - CPI-090

FIG. 12A

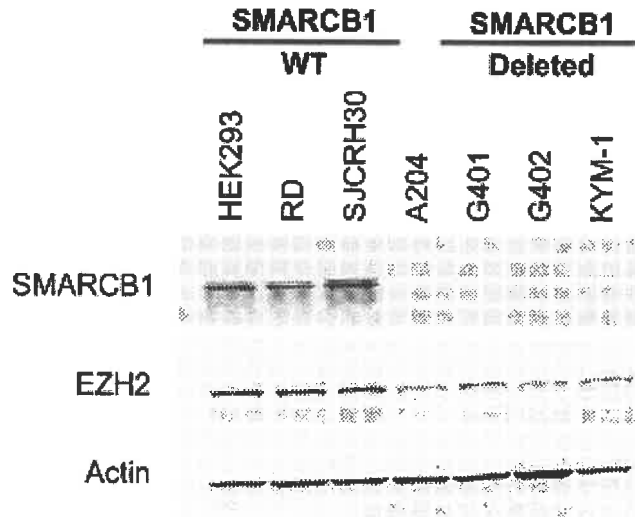


FIG. 12B

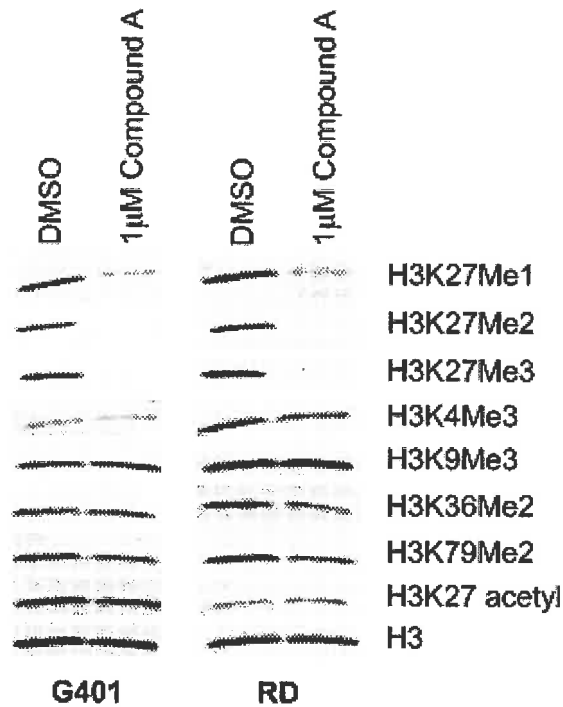


FIG. 13A

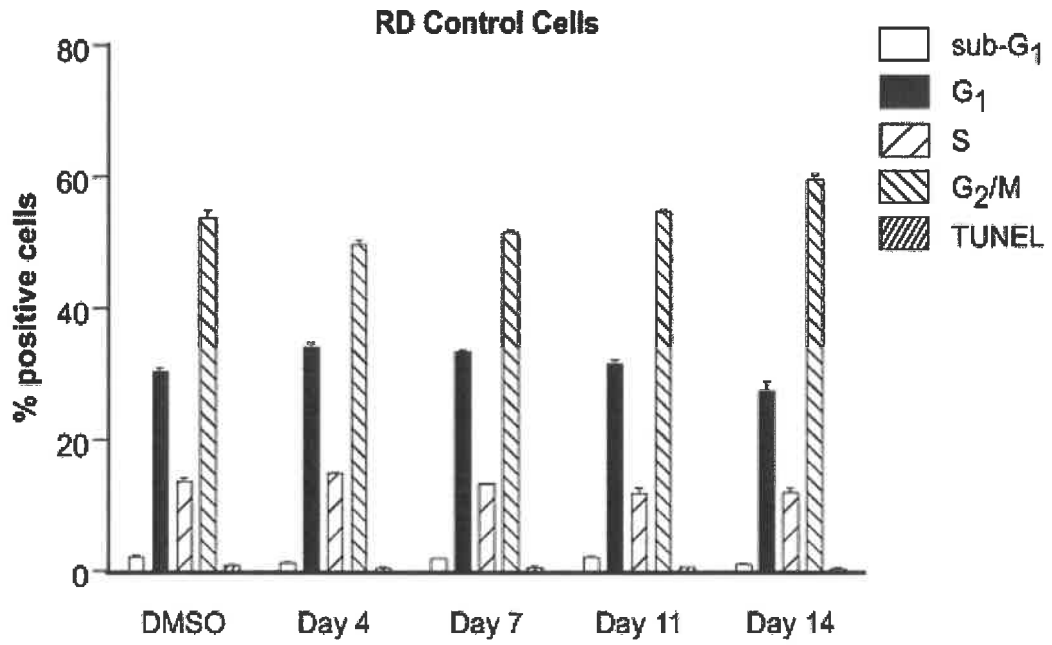


FIG. 13B

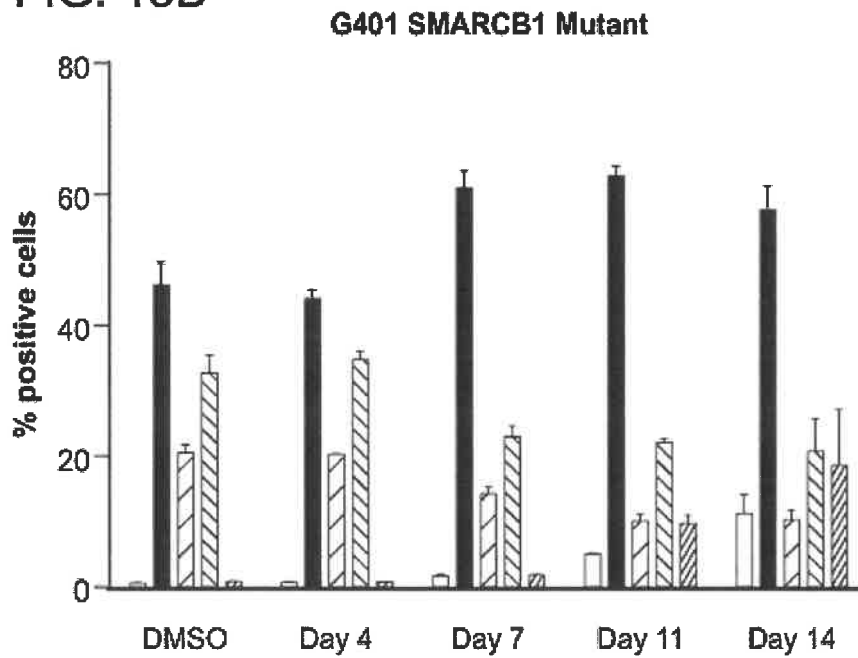


FIG. 14A

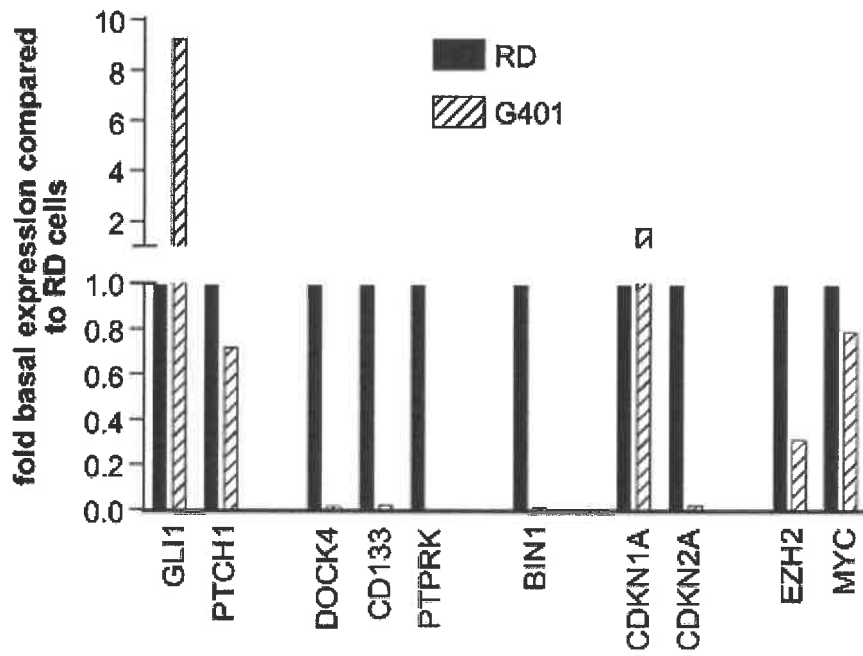


FIG. 14B-a

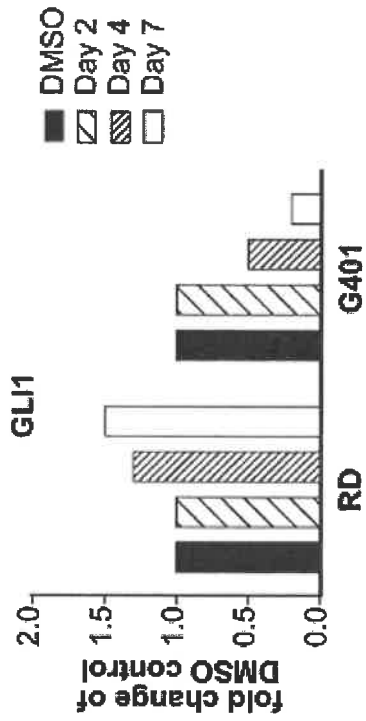


FIG. 14B-b

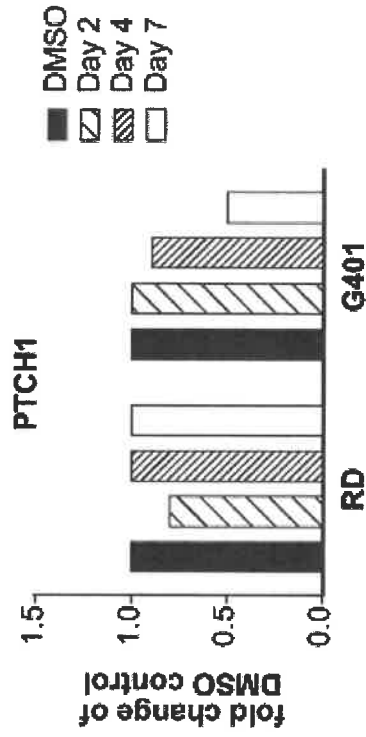


FIG. 14B-c

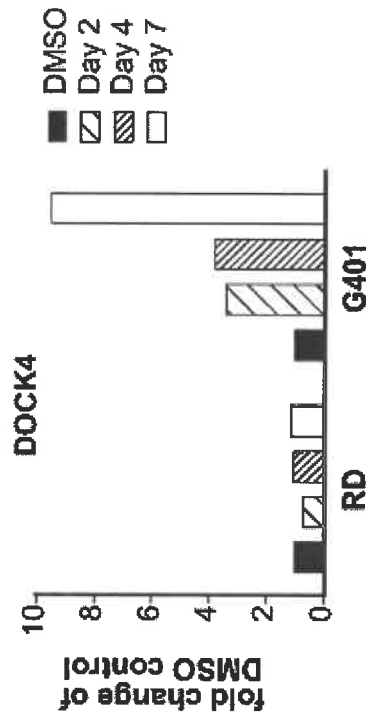


FIG. 14B-d

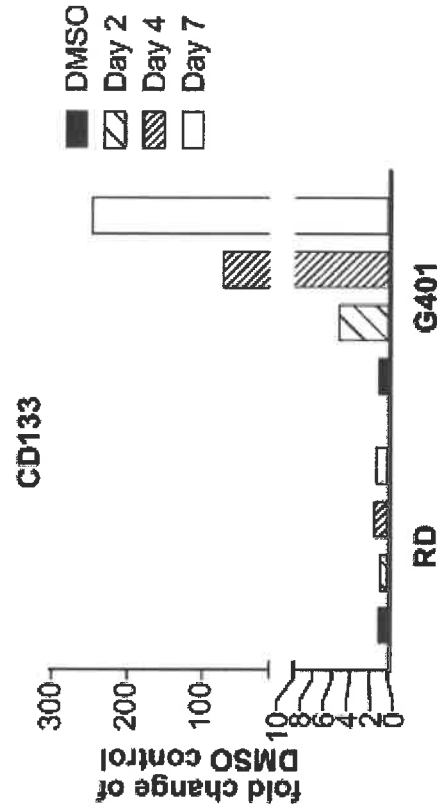


FIG. 14B-f

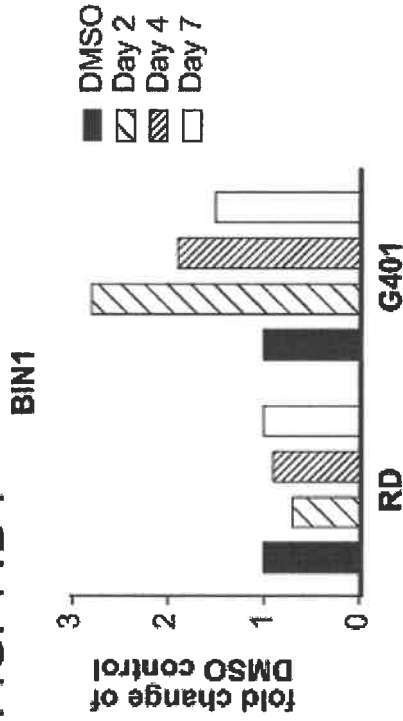


FIG. 14B-h

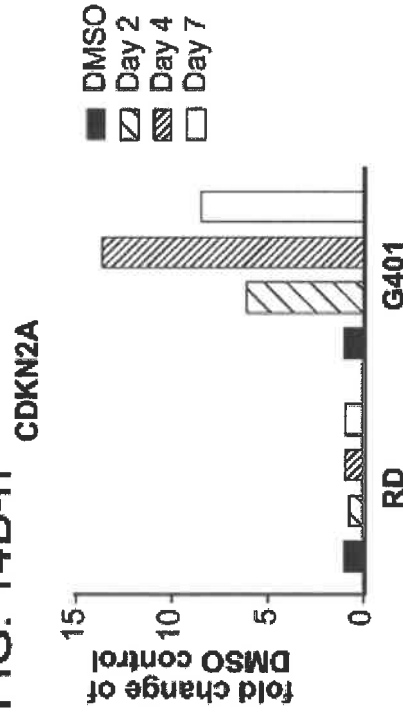


FIG. 14B-e

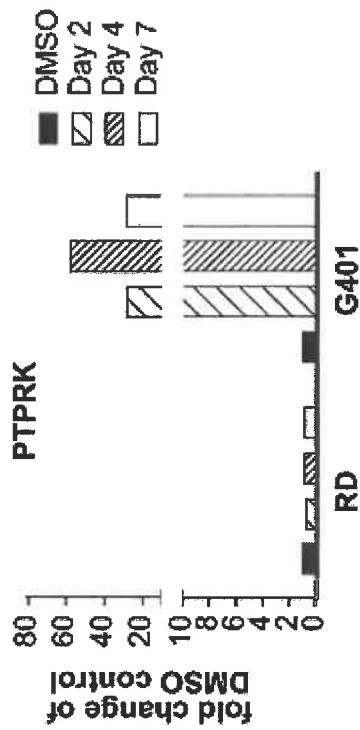


FIG. 14B-g

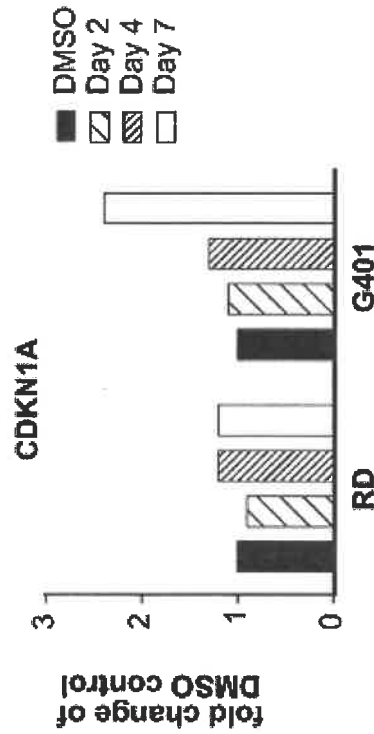


FIG. 14B-j

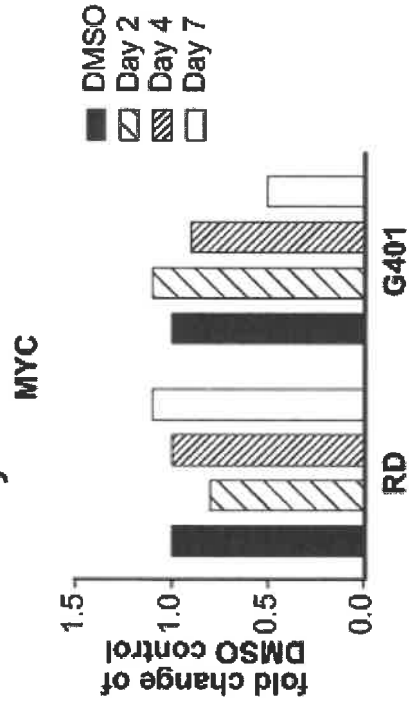


FIG. 14B-i

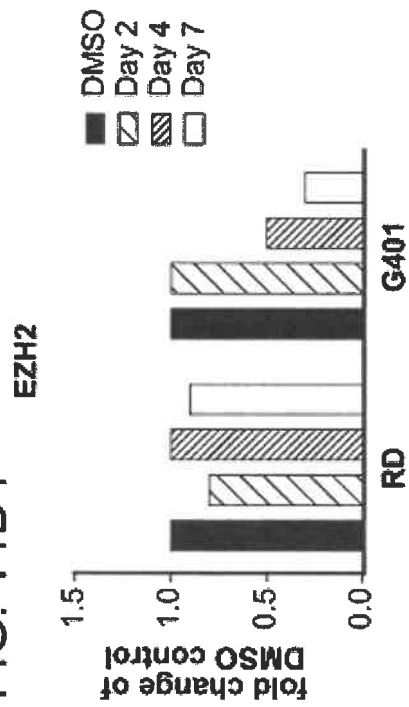


FIG. 14C

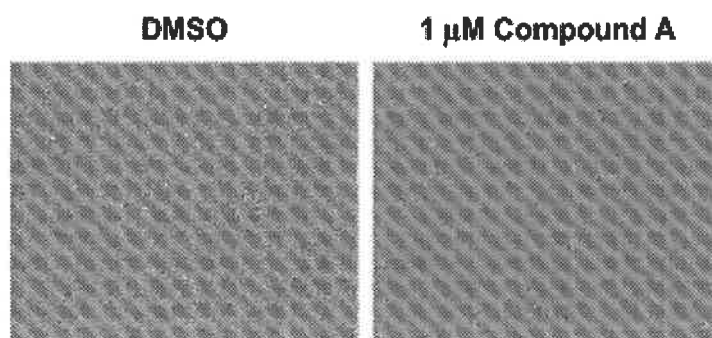


FIG. 15A

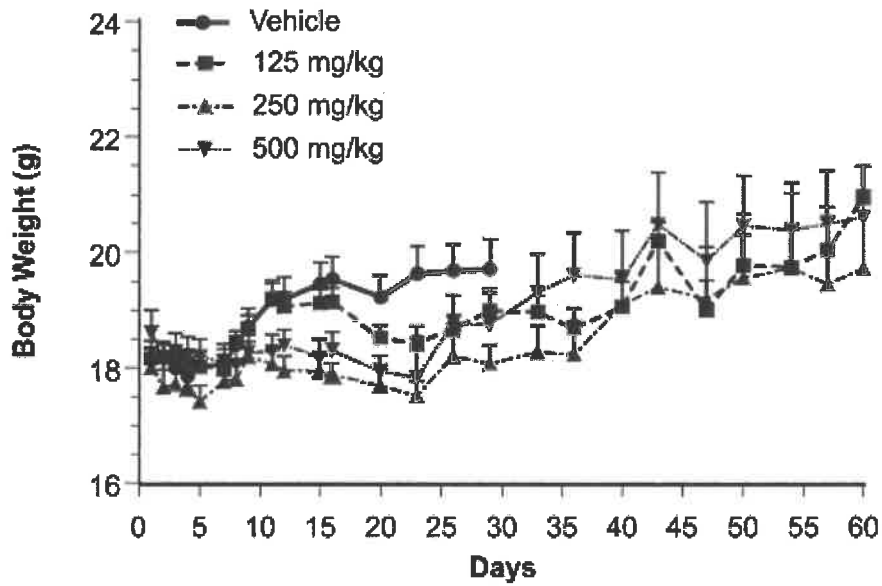


FIG. 15B

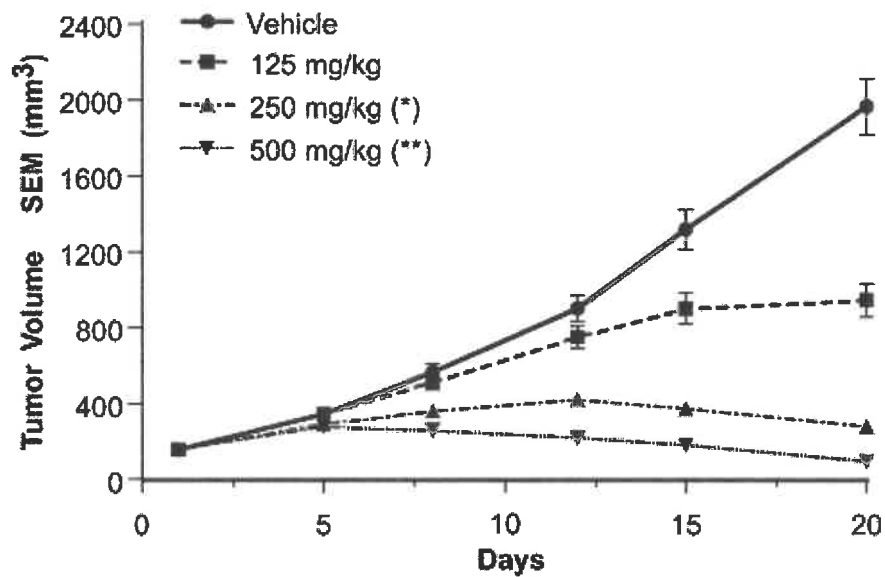




FIG. 16A

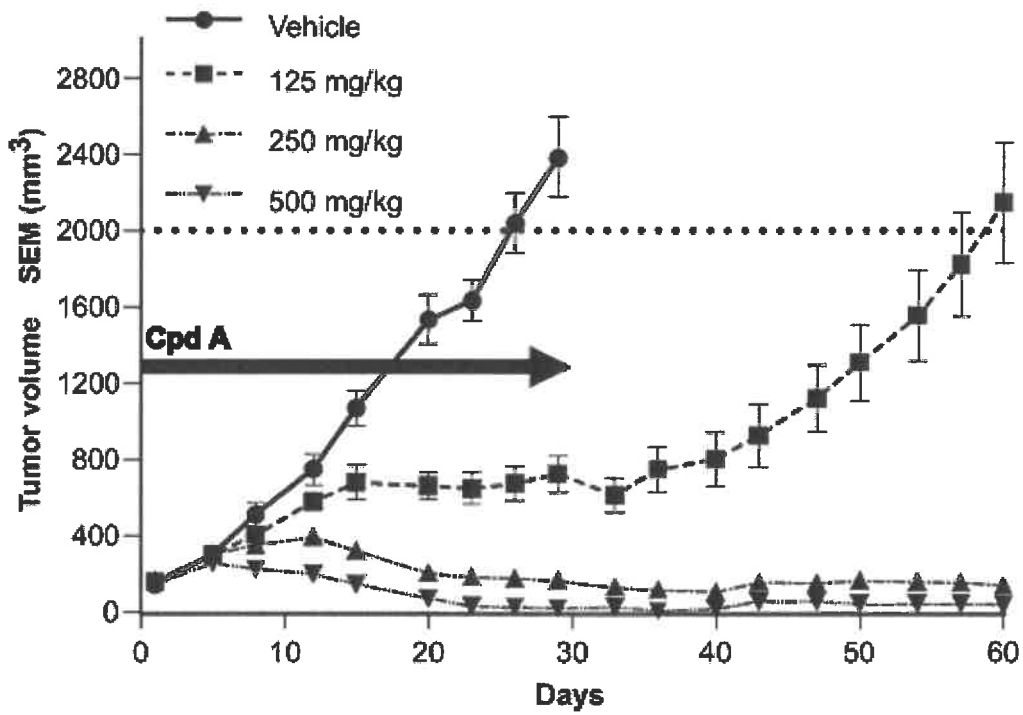


FIG. 16B

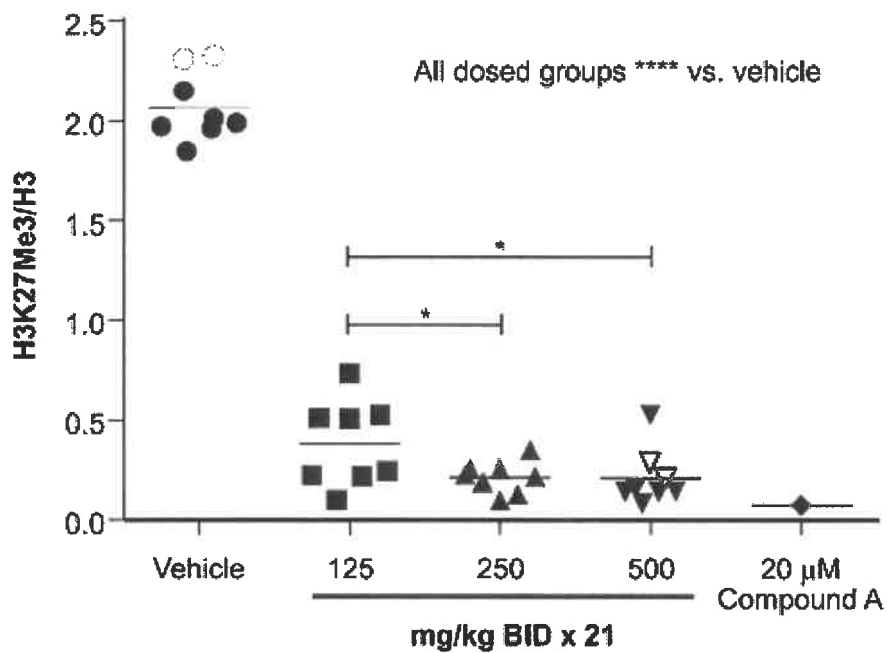


FIG. 16C-b

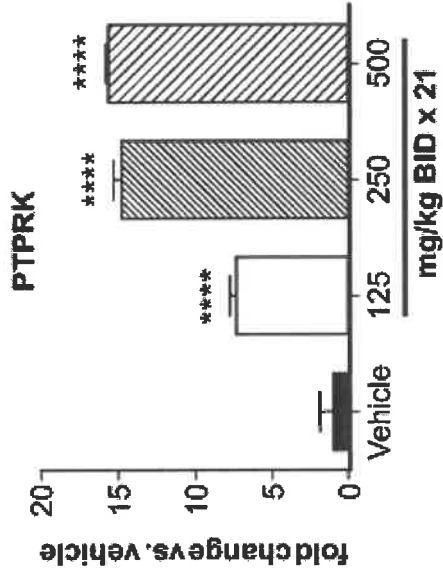


FIG. 16C-d

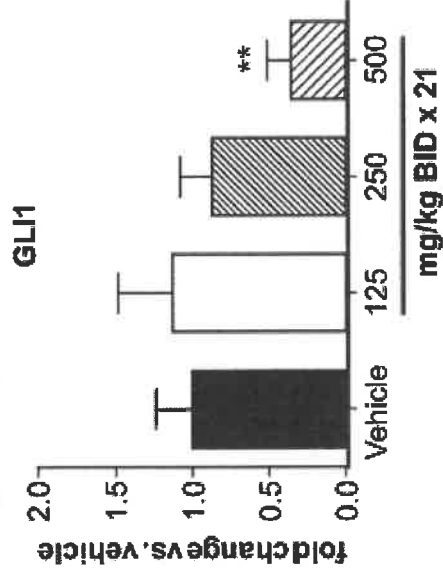


FIG. 16C-a

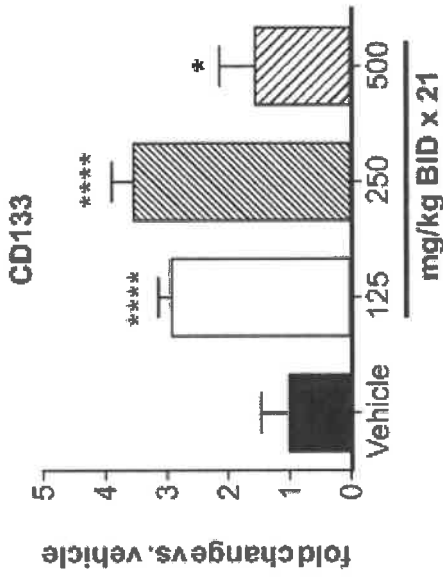


FIG. 16C-c

