

Traduzione del testo del brevetto europeo

No. 4 421 069

a nome: Yuhan Corporation

a: Seoul 06927 - COREA DEL SUD

dal titolo: Composti e composizioni per modulare le attività della chinasi mutante EGFR.

DESCRIZIONE

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione riguarda nuovi composti chimici e relative composizioni accettabili dal punto di vista farmaceutica che mostrano attività di inibizione contro alcune forme mutate di EGFR.

PRECEDENTE DELL'INVENZIONE

Le proteine chinasi catalizzano il trasferimento del fosfato terminale dall'ATP o dal GTP al gruppo idrossilico dei residui di tirosina, serina e/o treonina delle proteine. Le proteine chinasi sono suddivise in famiglie in base ai substrati che fosforilano, ad esempio le proteine tirosina chinasi (PTK) e le proteine serina/treonina chinasi. La fosforilazione tramite protein-chinasi determina un cambiamento funzionale della proteina bersaglio (substrato), modificando l'attività enzimatica, la localizzazione cellulare o l'associazione con altre

proteine. Le proteine chinasi svolgono un ruolo vitale in diversi processi cellulari: proliferazione cellulare, sopravvivenza cellulare, metabolismo, utilizzo dei carboidrati, sintesi proteica, angiogenesi, crescita cellulare e risposta immunitaria.

La cattiva regolazione delle proteine chinasi è stata implicata in numerose malattie e disturbi come i disturbi del sistema nervoso centrale (ad esempio, il morbo di Alzheimer), i disturbi infiammatori e autoimmuni (ad esempio, l'asma, l'artrite reumatoide, il morbo di Crohn, la sindrome infiammatoria intestinale e la psoriasi), le malattie delle ossa (ad esempio, l'osteoporosi), i disturbi metabolici (ad esempio, il diabete), i disturbi proliferativi dei vasi sanguigni, le malattie oculari, le malattie cardiovascolari, il cancro, la restenosi, la sensazione di dolore, il rigetto dei trapianti e le malattie infettive.

Tra questi, la sovraespressione e la misregolazione dell'EGFR si riscontrano comunemente nei tumori della mammella, del polmone, del pancreas, della testa e del collo e della vescica. L'EGFR è una proteina tirosina chinasi transmembrana appartenente alla famiglia dei recettori erbB. Al legame di un ligando del fattore di

crescita, come il fattore di crescita epidermico (EGF), il recettore può dimerizzare con EGFR o con un altro membro della famiglia, come erbB2 (HER2), erbB3 (HER3) ed erbB4 (HER4). La dimerizzazione dei recettori erbB porta alla fosforilazione di residui tirosinici chiave nel dominio intracellulare e, in sequenza, alla stimolazione di numerose vie di trasduzione del segnale intracellulare coinvolte nella proliferazione e nella sopravvivenza cellulare. L'errata regolazione della segnalazione della famiglia erbB promuove la proliferazione, l'invasione, le metastasi, l'angiogenesi e la sopravvivenza del tumore ed è stata descritta in molti tumori umani, come quelli del polmone e della mammella.

Pertanto, la famiglia erbB è un bersaglio razionale per lo sviluppo di farmaci antitumorali e sono ora disponibili in clinica numerosi composti che hanno come bersaglio EGFR o erbB2, tra cui gefitinib (IRESSA™) ed erlotinib (TARCEVA™), l'inibitore di prima generazione. È stato riportato che le mutazioni attivanti dell'EGFR più comuni, L858R e del E746-A750, sono sensibili al trattamento con gefitinib o erlotinib, ma in ultima analisi la resistenza acquisita alla terapia con gefitinib o erlotinib deriva prevalentemente dalla mutazione del residuo

gatekeeper T790M, che viene rilevata in circa la metà dei pazienti clinicamente resistenti, dando origine a doppi mutanti, L858R/T790M e del E746-A750/T790M.

L'importanza biologica e clinica dei mutanti EGFR è stata riconosciuta nel campo e diversi farmaci di seconda generazione, come BIBW2992 (Afatinib), HKI-272 e PF0299804, sono in fase di sviluppo e sono efficaci contro la mutazione di resistenza T790M, ma mostrano contemporaneamente una forte inibizione dell'EGFR wildtype (WT), che causa gravi effetti avversi. Pertanto, esiste ancora una forte necessità di composti che inibiscano in modo potente i mutanti singoli e doppi dell'EGFR e che siano selettivi rispetto all'EGFR WT per fornire una terapia clinica efficace e sicura per le malattie associate o mediate dai mutanti dell'EGFR.

Il brevetto US US2010029610 divulga inibitori della chinasi EGFR basati su piramidine sostituite.

Un altro esempio di cattiva regolazione delle proteine chinasi che è stata implicata in numerose malattie e disturbi è la Janus chinasi (JAK) 3. A differenza dell'espressione relativamente ubiquitaria dei membri della famiglia Janus, JAK1, JAK2 e Tyk2, JAK3 è espresso prevalentemente nei lignaggi ematopoietici come le cellule NK, le cellule T e le cellule B e nelle

cellule epiteliali intestinali. Prendere di mira JAK3 potrebbe essere una strategia utile per generare una nuova classe di farmaci immunosoppressori. Data l'espressione primaria nelle cellule ematopoietiche, un inibitore JAK3 altamente selettivo dovrebbe avere effetti precisi sulle cellule immunitarie e difetti pleiotropici minimi. La selettività di un inibitore di JAK3 avrebbe anche dei vantaggi rispetto agli attuali farmaci immunosoppressori ampiamente utilizzati, che hanno numerosi bersagli e diversi effetti collaterali. Un inibitore di JAK3 potrebbe essere utile per il trattamento di malattie autoimmuni, leucemie e linfomi mediati da JAK3.

Ad esempio, mutazioni somatiche di JAK3 sono state identificate anche in una minoranza di pazienti con leucemia megacarioblastica acuta (AMKL) sia nei bambini con sindrome di Down che negli adulti non affetti da sindrome di Down e in un paziente con leucemia linfoblastica acuta. Inoltre, l'attivazione di JAK3 è stata identificata in diversi disordini linfoproliferativi, tra cui il linfoma a cellule mantellari, il linfoma di Burkitt, la leucemia/linfoma a cellule T umane, la linfoalleucemia a cellule T adulte indotta da virus-1 e il linfoma anaplastico a grandi cellule. È stato dimostrato che l'attivazione

costitutiva della via JAK3/STAT ha un ruolo importante nella crescita e nella sopravvivenza delle cellule di leucemia e linfoma e nel fenotipo invasivo. Pertanto, l'attivazione costitutiva di JAK3, che può derivare da mutazioni attivanti JAK3, è una caratteristica frequente di diverse leucemie e linfomi, per cui l'inibizione selettiva di JAK3 potrebbe essere un obiettivo terapeutico.

Pertanto, esiste una forte necessità di composti che inibiscano selettivamente e potentemente il tipo selvatico e i mutanti di JAK3 e che siano selettivi rispetto ad altri membri della famiglia JAK per fornire una terapia clinica efficace e sicura per le malattie associate o mediate da JAK3.

Esiste inoltre la necessità di metodi per somministrare tali composti, formulazioni farmaceutiche e medicinali a pazienti o soggetti che ne hanno bisogno.

SINTESI DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a nuovi idrati e sali di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide e relative composizioni accettabili dal punto di vista farmaceutico che mostrano attività di inibizione contro determinate

forme mutate di EGFR.

L'invenzione fornisce idrati, sali farmaceuticamente accettabili e idrati di sali farmaceuticamente accettabili di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide, utili per il trattamento di una malattia o condizione selezionata dal gruppo costituito da cancro, rigetto di allotrapianto, malattia del trapianto contro l'ospite, retinopatia diabetica, neovascolarizzazione coroidale dovuta a degenerazione maculare senile, psoriasi, artrite, osteoartrite, artrite reumatoide, invasione del pannus sinoviale nell'artrite, sclerosi multipla, miastenia grave, diabete mellito, angiopatia diabetica, retinopatia della prematurità, fibrosi, aterosclerosi, ristensosi, malattie autoimmuni, allergie, malattie respiratorie, asma, rigetto da trapianto, infiammazione, trombosi, proliferazione dei vasi retinici, malattie infiammatorie intestinali, morbo di Crohn, colite ulcerosa, malattie ossee, rigetto di trapianti o trapianti di midollo osseo, lupus, pancreatite cronica, cachessia, shock settico, malattie o disturbi cutanei fibroproliferativi e differenziali, malattie del sistema nervoso centrale, malattie neurodegenerative, morbo di Alzheimer, morbo

di Parkinson, disturbi o condizioni correlati a danni ai nervi e degenerazione assonale conseguenti a lesioni cerebrali o del midollo spinale, malattie oculari, infezioni virali, malattie cardiache, malattie polmonari, malattie renali e bronchite.

La presente invenzione si riferisce inoltre a composizioni comprendenti questi composti. I metodi per produrre questi composti sono descritti nella presente. I composti della presente invenzione possono essere utilizzati in metodi di inibizione dell'attività enzimatica, in particolare di uno o più mutanti EGFR e dell'attività della chinasi JAK3, e possono essere utilizzati in un metodo di trattamento di malattie o sintomi di malattie nei mammiferi, in particolare nei casi in cui l'inibizione dell'attività della chinasi può influire sull'esito della malattia.

BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La FIG. 1 mostra la visualizzazione di Western blot che mostrano i risultati dell'inibizione del livello di fosforilazione dell'EGFR mutante rispetto all'EGFR wildtype.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

La presente invenzione fornisce un gruppo di idrati, sali farmaceuticamente accettabili e idrati di sali farmaceuticamente accettabili di N-(5-(4-(4-

((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide utili per inibire una o più proteine chinasi e per trattare malattie e disturbi mediati dalla proteina chinasi, ad esempio malattie e disturbi proliferativi cellulari come il cancro, malattie autoimmuni, infezioni, malattie cardiovascolari e malattie e disturbi neurodegenerativi. Nella presente sono descritti metodi per sintetizzare e somministrare gli idrati, sali farmaceuticamente accettabili e idrati di sali farmaceuticamente accettabili di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide. La presente invenzione fornisce anche formulazioni farmaceutiche comprendenti almeno uno degli idrati, sali farmaceuticamente accettabili e idrati di sali farmaceuticamente accettabili di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide insieme a un veicolo, diluente o un suo eccipiente farmaceuticamente accettabile. L'invenzione fornisce inoltre intermedi utili generati durante la sintesi di composti derivati da aminopirimidine.

La presente invenzione fornisce composizioni che possono essere usate in metodi per modulare l'attività dei mutanti del recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR) e/o della Janus chinasi 3 (JAK3). I composti della presente invenzione possono agire come inibitori di mutanti EGFR o JAK3.

In una prima forma di realizzazione, viene fornito nella presente un composto che è una forma di idrato di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide.

In una seconda forma di realizzazione, viene fornito nella presente un composto che è una forma di idrato o un suo sale farmaceuticamente accettabile di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide.

In una terza forma di realizzazione, viene qui fornito un composto che è un sale farmaceuticamente accettabile di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide e un acido selezionato tra bromidrico, cloridrico, solforico, nitrico, fosforico, succinico, maleico, formico, acetico, propionico, fumarico, citrico, tartarico,

lattico, benzoico, salicilico, glutammico, aspartico, p-toluensolfonico, benzensolfonico, metansolfonico, etansolfonico, naftalensolfonico o esanoico.

In alcune forme di realizzazione dei composti che sono forme idrate di un sale farmaceuticamente accettabile di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide, il sale farmaceuticamente accettabile è un sale di un acido selezionato tra bromidrico, cloridrico, solforico, nitrico, fosforico, succinico, maleico, formico, acetico, propionico, fumarico, citrico, tartarico, lattico, benzoico, salicilico, glutammico, aspartico, p-toluensolfonico, benzensolfonico, metansolfonico, etansolfonico, naftalensolfonico o esanoico.

In una ulteriore forma di realizzazione, il composto è una forma idrata di un sale dell'acido metansolfonico di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide.

In una ulteriore forma di realizzazione, il composto è un sale dell'acido metansolfonico di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide.

I composti della presente invenzione possono essere usati in un metodo per trattare una malattia mediata da proteine chinasi in un soggetto che ne ha bisogno, comprendente somministrare a detto soggetto una quantità terapeuticamente efficace di un composto dell'invenzione, che è efficace nel trattare la crescita cellulare anormale e la malattia autoimmune.

I composti della presente invenzione possono essere utilizzati in un metodo per inibire selettivamente almeno un mutante dell'EGFR rispetto all'EGFR di tipo selvatico, in un campione biologico o in un paziente, comprendente il contatto del campione biologico con o la somministrazione al paziente di un composto secondo l'invenzione, o una composizione dello stesso (ad esempio, una composizione farmaceutica comprendente il composto dell'invenzione e un veicolo farmaceuticamente accettabile). In determinate forme di realizzazione, l'almeno un mutante è Del E746-A750, L858R o T790M. In determinate forme di realizzazione, l'almeno un mutante è almeno un doppio mutante selezionato tra E746-A750/T790M o L858R/T790M.

I composti della presente invenzione possono essere utilizzati in un metodo per inibire selettivamente la Janus chinasi 3 (JAK3) rispetto ad altre chinasi, in campioni biologici o in pazienti, che comprende il

contatto del campione biologico con o la somministrazione al paziente di un composto dell'invenzione, o una sua composizione, efficace nel trattamento della crescita cellulare anomala, tra cui leucemia e linfoma (cellule B e cellule T) e malattie immunitarie, tra cui artrite, artrite reumatoide e malattie autoimmuni.

I composti della presente invenzione possono essere usati nella fabbricazione di un farmaco per trattare la malattia mediata da proteine chinasi. Inoltre, i composti dell'invenzione possono essere usati nella fabbricazione di un farmaco per inibire almeno un mutante di EGFR in modo selettivo rispetto a EGFR di tipo selvatico.

Le composizioni farmaceutiche comprendenti un composto dell'invenzione possono essere usate nel trattamento della malattia mediata da proteine chinasi. Inoltre, una composizione farmaceutica comprendente un composto dell'invenzione può essere usata per inibire almeno un mutante di EGFR in modo selettivo rispetto a EGFR di tipo selvatico.

Il termine "etero" si riferisce alla sostituzione di almeno un atomo di carbonio membro in un sistema ad anello con almeno un eteroatomo come azoto, zolfo e ossigeno.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "arile" si riferisce a gruppi monociclici o policiclici aromatici non sostituiti o sostituiti e comprende, ad esempio, fenile e naftile. Il termine "arile" comprende anche un anello fenilico fuso con un anello carbociclico o eterociclico non aromatico. Il termine "arile" può essere usato indifferentemente con "anello arile", "gruppo aromatico" e "anello aromatico". " I gruppi eteroarilici hanno da 4 a 14 atomi, di cui da 1 a 9 indipendentemente selezionati dal gruppo costituito da ossigeno, zolfo e azoto. I gruppi eteroarile hanno 1-3 eteroatomi in un gruppo aromatico a 5-8 membri. Un arile o un eteroarile può essere un gruppo aromatico mono o biciclico. Tipici gruppi arilici ed eteroarilici includono, ad esempio, fenile, chinolinile, indazoile, indolile, diidrobenzodiossinile, 3-clorofenile, 2,6-dibromofenile, piridile, pirimidinile, 3-metilpiridile, benzotienile, 2,4,6-tribromofenile, 4-etilbenzotienile, furanile, 3,4-dietilfuranile, naftile, 4,7-dicloroaftile, pirrolo, pirazolo, imidazolo, tiazolo e simili. Un arile o un eteroarile può essere non sostituito o sostituito con uno o più sostituenti adatti.

Come utilizzato nel presente documento, il termine

"idrossile" o "idrossi" si riferisce a -OH.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "ammino" si riferisce a -NH₂.

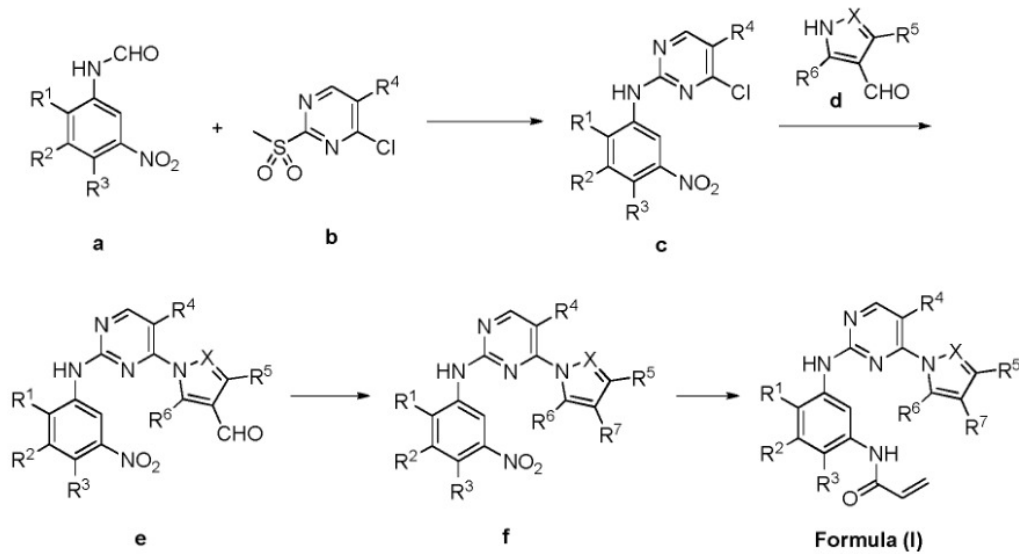
Un "sostituente", come utilizzato nel presente documento, si riferisce a una moietà molecolare che è legata in modo covalente a un atomo all'interno di una molecola di interesse. Ad esempio, un sostituente dell'anello può essere un elemento come un alogeno, un gruppo alchilico, un gruppo alogenidrico o un altro gruppo legato covalentemente a un atomo (preferibilmente di carbonio o di azoto) che è un membro dell'anello. I sostituenti dei gruppi aromatici sono generalmente legati covalentemente a un atomo di carbonio dell'anello.

Come descritto in precedenza, alcuni gruppi possono essere non sostituiti o sostituiti con uno o più sostituenti adatti diversi dall'idrogeno in una o più posizioni disponibili, tipicamente 1, 2, 3, 4 o 5 posizioni, da uno o più gruppi adatti (che possono essere uguali o diversi). Alcuni gruppi, se sostituiti, sono sostituiti con 1, 2, 3 o 4 sostituenti selezionati in modo indipendente.

I composti della presente invenzione e gli intermedi possono essere forniti mediante (i) un metodo di preparazione di un composto di formula (c) facendo

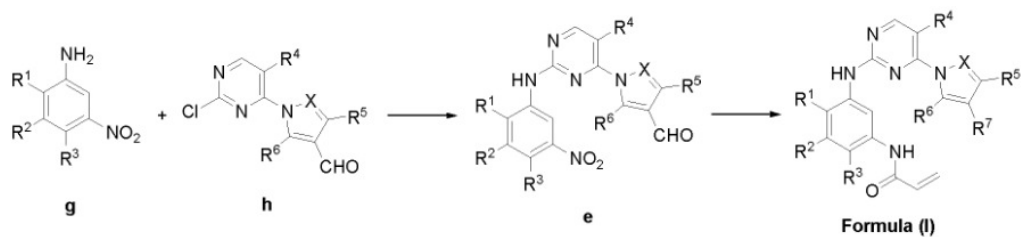
reagire un composto di formula (a) con un composto di formula (b) in presenza della prima base nel primo solvente organico (vedi Schema 1); (ii) un metodo di preparazione di un composto di formula (e) facendo reagire il composto di formula (c) con intermedi eteroarilici (d) in presenza della seconda base, nel secondo solvente organico (vedi Schema 1); (iii) un metodo per preparare un composto di formula (f) mediante amminazione riduttiva del composto di formula (e) e di un derivato amminico utilizzando un agente riducente nel terzo solvente (vedi Schema 1); (iv) un metodo per preparare un composto di formula (I) mediante riduzione del composto di formula (f) utilizzando un agente riducente nel quarto solvente e seguita dalla formazione di ammidi in presenza di cloruro di acriloloile, la terza base nel quinto solvente (si veda lo Schema 1). Un composto di Formula (I) può essere preparato secondo lo Schema 1.

Schema 1



Un composto di formula (e) può essere preparato mediante reazione del composto di formula (h) con intermedi di anilina (g) in presenza della quarta base nel primo solvente, un ligando, un catalizzatore di palladio nel primo solvente organico (si veda lo Schema 2). Un composto di Formula (I) può essere preparato secondo lo Schema 2.

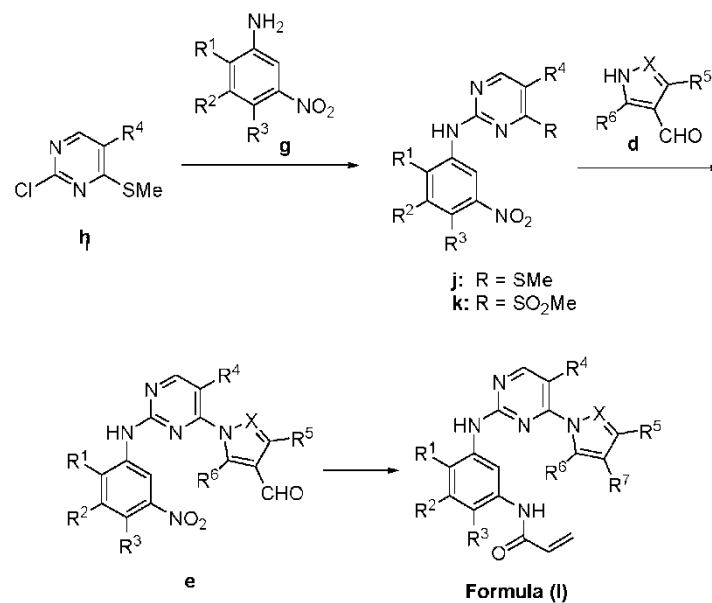
Schema 2



I composti della presente invenzione e gli intermedi possono essere forniti mediante (i) un metodo di preparazione di un composto di formula (j) dal composto di formula (i) con intermedi di anilina (g) con la procedura descritta in WO2013/109882 A1; (ii) un

metodo di preparazione di un composto di formula (j) a partire dal composto di formula (j) mediante ossidazione con mCPBA o Oxone® come descritto in WO2013/109882 A1; (iii) un metodo per preparare il composto di formula (e) a partire da un composto di formula (k) mediante reazione con il composto di formula (d) in presenza della seconda base nel secondo solvente organico (vedi Schema 3). Un composto di Formula (I) può essere preparato secondo lo Schema 3.

Schema 3



Con riferimento agli Schemi 1-3, mentre i solventi di reazione appropriati possono essere selezionati da una persona di comune abilità nella tecnica, il primo solvente organico è generalmente selezionato tra solventi aprotici relativamente polari come acetone, tetraidrofurano, N,N-dimetilformammide, N,N-dimetilacetammide, diclorometano, dicloroetano o

acetonitrile; il secondo solvente organico è generalmente selezionato tra solventi aprotici come toluene, diossano, tetraidrofurano, N,N-dimetilformammide, N,N-dimetilacetammide o N-metilmorfolina; il terzo solvente organico è generalmente selezionato tra solventi relativamente polari come tetraidrofurano, metanolo, etanolo, diclorometano, dicloroetano, N,N-dimetilacetamide o N,N-dimetilformamide; il quarto solvente è generalmente selezionato tra solventi relativamente polari e protici come metanolo, etanolo, tert-butanolo o acqua, e il quinto solvente è generalmente selezionato tra solventi come diclorometano, tetraidrofurano, N,N-dimetilformammide, N,N-dimetilacetammide o acqua.

Con riferimento agli Schemi 1-3, mentre le basi e gli altri reagenti possono essere selezionati da un esperto della tecnica, la prima e la seconda base sono generalmente selezionate tra basi come K_2CO_3 , Cs_2CO_3 , NaOH, KOH, NaH, tert-BuOK, tert-BuONa, trietilammina o diisopropilettilammina; la prima base è generalmente selezionata tra basi quali trietilammina, diisopropilettilammina, NaH, $NaHCO_3$, tert-BuOK, tert-BuONa, Cs_2CO_3 , o K_2CO_3 ; la quarta base è selezionata generalmente tra basi come NaH, n-BuLi, Cs_2CO_3 ,

triethylamina o diisopropyletilamina; un catalizzatore di palladio è generalmente selezionato da $\text{Pd}(\text{OAc})_2$, $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$, $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, o $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$; un ligando è generalmente selezionato da BINAP, Xantphos o S-Phos; l'agente ossidante è selezionato da agenti ossidanti come l'acido m-cloroperbenzoico (mCPBA) o Oxone®; e l'agente riducente è generalmente selezionato da $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, NaBH_4 , o $\text{NaBH}(\text{CN})_3$.

I composti rappresentativi della Formula (I) sono elencati di seguito:

N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide,

o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "cancro" si riferisce a una crescita anormale di cellule che tendono a proliferare in modo incontrollato e, in alcuni casi, a metastatizzare. I tipi di cancro includono, ma non solo, i tumori solidi, come quelli della vescica, dell'intestino, del cervello, del seno, dell'endometrio, del cuore, del rene, del polmone, del tessuto linfatico (linfoma), dell'ovaio, del pancreas o di altri organi endocrini (tiroide), della prostata, della pelle (melanoma) o i tumori ematologici (come le leucemie).

Come utilizzato nel presente documento, il termine "mutazione EGFR" si riferisce alla mutazione T790M (resistente o oncogena), L858R (attivante), del E746-A750 (attivante) o una loro combinazione.

I composti della presente invenzione possono inibire selettivamente una mutazione attivante e una mutazione puntiforme. Una almeno una mutazione attivante può essere una mutazione di delezione, del E746-A750. Una almeno una mutazione attivante può essere una mutazione di punto L858R. L'almeno una mutazione resistente può essere una mutazione di punto, T790M. L'almeno una mutazione di EGFR può essere L858R e/o T790M.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "inibizione selettiva del mutante", rispetto all'inibizione dell'EGFR wildtype (WT), si riferisce allo stato in cui l'invenzione inibisce almeno una mutazione dell'EGFR (cioè almeno una mutazione di delezione, almeno una mutazione attivante, almeno una mutazione resistente o una combinazione di almeno una mutazione di delezione e almeno una mutazione puntiforme) in almeno un saggio descritto nel presente documento (per esempio, biochimico o cellulare).

Come utilizzato nel presente documento, il termine "inibisce selettivamente", rispetto all'inibizione di

altre chinasi, si riferisce all'invenzione che inibisce scarsamente almeno uno dei pannelli di chinasi.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "selettività dell'EGFR wildtype" si riferisce al fatto che un inibitore selettivo di almeno una mutazione dell'EGFR, come definito e descritto in precedenza e nel presente documento, inibisce l'EGFR al limite superiore di rilevamento di almeno un saggio come descritto nel presente documento (ad esempio cellulare come descritto in dettaglio nella Tabella 1 e nella Tabella 2). Il termine "selettività dell'EGFR wildtype" può significare che l'invenzione inibisce l'EGFR WT con un IC_{50} di almeno 200-1000nM o $> 1000nM$. Come utilizzato nel presente documento, il termine "inibitore" si riferisce a un composto che inibisce una o più chinasi qui descritte. Ad esempio, il termine "inibitore del mutante EGFR" si riferisce a un composto che inibisce il recettore mutante EGFR o ne riduce l'effetto di segnalazione.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "farmaceuticamente accettabile" si riferisce a un materiale, come un vettore o un diluente, che non abroga l'attività biologica o le proprietà dei composti qui descritti. Tali materiali vengono

somministrati a un individuo senza causare effetti biologici indesiderati o interagire in modo deleterio con uno qualsiasi dei componenti della composizione in cui sono contenuti.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "sale farmaceuticamente accettabile" si riferisce a una formulazione di un composto che non causa irritazioni significative a un organismo a cui viene somministrato e non abroga l'attività biologica e le proprietà dei composti qui descritti.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "combinazione farmaceutica" indica un prodotto che risulta dalla miscelazione o dalla combinazione di più di un ingrediente attivo.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "composizione farmaceutica" si riferisce a una miscela di un composto qui descritto con altri componenti chimici, come vettori, stabilizzanti, diluenti, agenti disperdenti, agenti di sospensione, agenti addensanti e/o eccipienti.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "profarmaco" si riferisce a un agente che viene convertito *in vivo* nel farmaco progenitore. I profarmaci sono spesso utili perché, in alcune situazioni, possono essere più facili da somministrare

rispetto al farmaco madre. I profarmaci sono biodisponibili con la somministrazione orale, mentre il progenitore non lo è. I profarmaci migliorano la solubilità nelle composizioni farmaceutiche rispetto al farmaco progenitore. Un esempio non limitativo di profarmaco dei composti qui descritti è un composto qui descritto somministrato come estere che viene poi idrolizzato metabolicamente ad un acido carbossilico, l'entità attiva, una volta all'interno della cellula. Un altro esempio di profarmaco è un breve peptide legato a un gruppo acido, dove il peptide viene metabolizzato per rivelare la parte attiva.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "malattia mediata da proteine chinasi" o "disturbo o malattia o condizione mediata da un'attività inappropriata delle proteine chinasi" si riferisce a qualsiasi stato patologico mediato o modulato dalle proteine chinasi qui descritte. Tali stati patologici includono, ma non solo, il cancro al polmone non a piccole cellule (NSCLC).

Come utilizzato nel presente documento, il termine "malattia mediata da EGFR mutante" o "disturbo o malattia o condizione mediata da un'attività inappropriata dell'EGFR" si riferisce a qualsiasi stato patologico mediato o modulato da meccanismi di

chinasi mutante dell'EGFR. Tali stati patologici includono, ma non solo, il NSCLC, il cancro al cervello metastatico e altri tumori solidi.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "malattia mediata da JAK3" o "disturbo o malattia o condizione mediata da un'attività inappropriata di JAK3" si riferisce a qualsiasi stato patologico mediato o modulato dai meccanismi della chinasi JAK3. Tali stati patologici includono, ma non solo, l'artrite reumatoide, la psoriasi, il rigetto dei trapianti d'organo e alcuni tumori solidi.

Come usato nel presente documento, il termine "trattare", "trattando" o "trattamento" si riferisce a metodi per alleviare, ridurre o migliorare i sintomi di una malattia o di una condizione, per prevenire ulteriori sintomi, per migliorare o prevenire le cause metaboliche sottostanti dei sintomi, per inibire la malattia o la condizione, per arrestare lo sviluppo della malattia o della condizione, per alleviare la malattia o la condizione, per far regredire la malattia o la condizione, per alleviare una condizione causata dalla malattia o dalla condizione o per arrestare i sintomi della malattia o della condizione a livello profilattico e/o terapeutico.

Come utilizzato nel presente documento, il termine

"solvato" si riferisce a un complesso di stechiometria variabile formato da un soluto (nella presente invenzione, un composto di Formula (I) o un suo sale farmaceuticamente accettabile) e un solvente. Tali solventi, ai fini dell'invenzione, non devono interferire con l'attività biologica del soluto. Esempi non limitativi di solventi adatti sono acqua, acetone, metanolo, etanolo e acido acetico. Il solvente utilizzato è preferibilmente un solvente farmaceuticamente accettabile. Esempi non limitativi di solventi farmaceuticamente accettabili includono acqua, etanolo e acido acetico.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "soggetto" o "paziente" comprende mammiferi e non mammiferi. Esempi di mammiferi includono, ma non solo, esseri umani, scimpanzé, scimmie, bovini, cavalli, pecore, capre, suini; conigli, cani, gatti, ratti, topi, porcellini d'India e simili. Esempi di non mammiferi includono, ma non sono limitati a, uccelli, pesci e simili.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "somministrazione" o "somministrare" del composto soggetto si riferisce alla fornitura di un composto dell'invenzione e/o di suoi prodromi a un soggetto che necessita di trattamento.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "vettore" si riferisce a composti o agenti chimici che facilitano l'incorporazione di un composto qui descritto in cellule o tessuti.

I termini "co-somministrazione" o "somministrazione combinata" o simili, utilizzati nel presente documento, si riferiscono alla somministrazione degli agenti terapeutici selezionati a un singolo paziente e includono regimi di trattamento in cui gli agenti non vengono necessariamente somministrati per la stessa via di somministrazione o nello stesso momento.

Il termine "accettabile" in riferimento a una formulazione, composizione o ingrediente, come qui utilizzato, significa che non ha effetti dannosi persistenti sulla salute generale del soggetto trattato.

Come utilizzato nel presente documento, il termine "diluente" si riferisce a composti chimici utilizzati per diluire un composto qui descritto prima della somministrazione. I diluenti possono essere utilizzati anche per stabilizzare i composti qui descritti.

Come utilizzato nel presente documento, i termini "quantità efficace" o "quantità terapeuticamente efficace" si riferiscono alla somministrazione di una quantità sufficiente di un composto qui descritto che

allevierà in qualche misura uno o più sintomi della malattia o della condizione trattata. Il risultato può essere la riduzione e/o l'alleviamento dei segni, sintomi, o cause di una malattia, o qualsiasi altra alterazione desiderata di un sistema biologico. Per esempio, una "quantità efficace" per usi terapeutici è la quantità della composizione comprendente un composto come descritto qui richiesto per fornire una diminuzione clinicamente significativa nei sintomi della malattia. Una quantità "efficace" appropriata in ogni singolo caso può essere determinata utilizzando tecniche, come uno studio di incremento della dose. A titolo puramente esemplificativo, una quantità terapeuticamente efficace di un composto dell'invenzione può essere compresa nell'intervallo, ad esempio, tra circa 0,01 mg/kg/giorno e circa 100 mg/kg/giorno, oppure tra circa 0,1 mg/kg/giorno e circa 10 mg/kg/giorno.

Proteina chinasi umana

I composti della presente invenzione sono sottoposti a screening contro il pannello delle chinasi (wild type e/o loro mutazioni) e inibiscono l'attività di almeno una chinasi del pannello delle chinasi. Esempi di chinasi includono, ma non solo, le chinasi EGFR e JAK3 (catalitica del dominio JH1) e le loro forme

mutanti. In quanto tali, i composti e le composizioni dell'invenzione sono utili per il trattamento di malattie o disturbi in cui tali chinasi contribuiscono alla patologia e/o alla sintomatologia di una malattia o di un disturbo associato o mediato da tale chinasi. Molte malattie sono associate a risposte cellulari anomale innescate da eventi mediati da protein-chinasi. Queste malattie includono, ma non solo, malattie autoimmuni, malattie infiammatorie, malattie ossee, malattie metaboliche, malattie neurologiche e neurodegenerative, cancro, malattie cardiovascolari, malattie respiratorie, allergie e asma, malattia di Alzheimer e malattie ormonali.

La fosforilazione regola una serie di processi cellulari come la proliferazione, la crescita, la differenziazione, il metabolismo, l'apoptosi, la motilità, la trascrizione, la traduzione e altri processi di segnalazione. L'attività aberrante o eccessiva delle PTK è stata osservata in molti stati patologici, come i disturbi proliferativi benigni e maligni, le malattie derivanti da un'attivazione inappropriata del sistema immunitario e le malattie derivanti da un'attivazione inappropriata del sistema nervoso. Malattie o condizioni specifiche includono, ma non sono limitate a, rigetto di allotrapianto,

malattia del trapianto *contro* l'ospite, retinopatia diabetica, neovascolarizzazione coroidale dovuta a degenerazione maculare legata all'età, psoriasi, artrite, osteoartrite, artrite reumatoide, invasione del panno sinoviale nell'artrite, sclerosi multipla, miastenia grave, diabete mellito, angiopatia diabetica, retinopatia della prematurità, emangiomi infantili, tumori non a piccole cellule del polmone, della vescica e della testa e del collo, cancro alla prostata, cancro al seno, cancro alle ovaie, cancro gastrico e pancreatico, psoriasi, fibrosi, aterosclerosi, restenosi, malattie autoimmuni, allergie, malattie respiratorie, asma, rigetto del trapianto, infiammazione, trombosi, proliferazione dei vasi retinici, malattia infiammatoria intestinale, morbo di Crohn, colite ulcerosa, malattie ossee, rigetto del trapianto o del trapianto di midollo osseo, lupus, malattie croniche pancreatite, cachessia, shock settico, malattie o disturbi fibroproliferativi e differenziativi della pelle, malattie del sistema nervoso centrale, malattie neurodegenerative, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, disturbi o condizioni correlati a danni ai nervi e degenerazione assonale conseguenti a una lesione cerebrale o del midollo spinale, cancro acuto o cronico, malattie oculari,

infezioni virali, malattie cardiache, malattie polmonari o renali e bronchite.

Recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR)

Il recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR; ErbB-1; HER1 nell'uomo) è il recettore della superficie cellulare per i membri della famiglia del fattore di crescita epidermico (famiglia EGF) dei ligandi delle proteine extracellulari. Il recettore del fattore di crescita epidermico è un membro della famiglia dei recettori ErbB, una sottofamiglia di quattro tirosin-chinasi recettoriali correlate: EGFR (ErbB-1), HER2/c-neu (ErbB-2), Her 3 (ErbB-3) e Her 4 (ErbB-4). Le mutazioni che influenzano l'espressione o l'attività dell'EGFR possono provocare il cancro.

L'EGFR è presente sulla superficie cellulare e viene attivato dal legame dei suoi ligandi specifici, tra cui il fattore di crescita epidermico e il fattore di crescita trasformante α (TGF α). Al momento dell'attivazione da parte dei ligandi dei fattori di crescita, l'EGFR passa da una forma monomericamente inattiva a un omodimero attivo. Oltre a formare omodimeri dopo il legame con il ligando, l'EGFR può accoppiarsi con un altro membro della famiglia dei recettori ErbB, come ErbB2/Her2/neu, per creare un eterodimero attivato. ErbB2 non ha un ligando

attivante diretto conosciuto e può essere in uno stato attivato costitutivamente o diventare attivo in seguito all'etero-dimerizzazione con altri membri della famiglia, come EGFR.

La dimerizzazione dell'EGFR stimola la sua intrinseca attività proteina-tirosina chinasi intracellulare. Di conseguenza, avviene l'autofosforilazione di diversi residui di tirosina (Y) nel dominio C-terminale dell'EGFR. Questi includono Y992, Y1045, Y1068, Y1148 e Y1173 nel dominio citoplasmatico. Questa autofosforilazione provoca l'attivazione e la segnalazione a valle da parte di diverse altre proteine che si associano alle tirosine fosforilate attraverso i propri domini SH2 legati alla fosfotirosina. Queste proteine di segnalazione a valle avviano diverse cascate di trasduzione del segnale, principalmente le vie MAPK, Akt e JNK, che portano alla sintesi del DNA e alla proliferazione cellulare. Tali proteine modulano fenotipi come la migrazione, l'adesione e la proliferazione cellulare. L'attivazione del recettore è importante per la risposta immunitaria innata nella pelle umana. Il dominio chinasi dell'EGFR può anche fosforilare in modo incrociato i residui di tirosina di altri recettori con cui è aggregato e può essere attivato in questo modo.

Le mutazioni che portano alla sovraespressione dell'EGFR (nota come upregulation) o alla sua iperattività sono state associate a diversi tipi di cancro, tra cui il cancro del polmone, il cancro anale e il glioblastoma multiforme. Queste mutazioni somatiche che coinvolgono l'EGFR portano alla sua costante attivazione, che produce una divisione cellulare incontrollata. Nel glioblastoma si osserva spesso una mutazione più o meno specifica dell'EGFR, chiamata EGFRvVIII. Mutazioni, amplificazioni o errate regolazioni di EGFR o di membri della famiglia sono implicate in circa il 30% di tutti i tumori epiteliali. La forma più comune di cancro al polmone è il carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC) e in un sottoinsieme di questi pazienti la crescita del tumore polmonare è causata da mutazioni attivanti nel recettore del fattore di crescita epidermico (EGFR). Le mutazioni attivanti più comuni, che rappresentano l'85-90% di tutte le mutazioni dell'EGFR, sono la delezione in-frame nell'esone 19 (DelE746-A750) e la mutazione puntiforme L858R nell'esone 21. Le mutazioni dell'EGFR sono presenti nel 10-15% dei pazienti NSCLC di origine caucasica e nel 30-35% dei pazienti NSCLC di origine asiatica. Le caratteristiche cliniche probabilmente associate alle mutazioni dell'EGFR sono

non fumatore e di etnia asiatica orientale.

Era noto che le mutazioni attivanti dell'EGFR più comuni, L858R e del E746-A750, erano sensibili al trattamento con gefitinib o erlotinib, che sono associati a tossicità dose-limitanti come diarrea e rash/acne in risposta all'inibizione dell'EGFR wildtype nell'intestino e nella pelle, rispettivamente. In definitiva, la resistenza acquisita alla terapia con gefitinib o erlotinib si verifica prevalentemente attraverso la mutazione del residuo gatekeeper T790M, che viene rilevata in quasi la metà dei pazienti clinicamente resistenti, dando luogo a doppi mutanti, L858R/T790M o del E746-A750/T790M.

Le metastasi cerebrali sono la neoplasia intracranica più comune, si verificano nell'8-10% dei pazienti oncologici e sono una causa significativa di morbilità e mortalità correlata al cancro in tutto il mondo. Le metastasi cerebrali si sviluppano in circa il 30% dei pazienti con carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC). Tra le varie istologie di NSCLC, la frequenza relativa di metastasi cerebrali nei pazienti con adenocarcinoma e carcinoma a grandi cellule era molto più alta di quella dei pazienti con carcinoma a cellule squamose.

I composti qui descritti sono inibitori dell'attività della chinasi mutante dell'EGFR e hanno un beneficio terapeutico nel trattamento dei disturbi associati all'attività inappropriata del mutante dell'EGFR, in particolare nel trattamento e nella prevenzione degli stati patologici mediati dal mutante dell'EGFR. Tali stati patologici includono il NSCLC, il cancro al seno, il cancro al cervello metastatico e altri tumori solidi.

Inoltre, i composti e le composizioni della presente invenzione possono essere usati in metodi di regolazione, e in particolare inibizione, di cascate di trasduzione di segnale in cui i mutanti EGFR svolgono un ruolo. Il metodo prevede generalmente il contatto di un recettore EGFR mutante-dipendente o di una cellula che esprime un recettore EGFR mutantedipendente con una quantità di un composto qui descritto, o di un prodrug di un composto qui descritto, o di un suo sale, idrato, solvato, N-ossido e/o composizione accettabile, efficace per regolare o inibire la cascata di trasduzione del segnale. I metodi sono utilizzati per regolare, e in particolare inibire, i processi a valle o le risposte cellulari suscitate dall'attivazione della particolare cascata di trasduzione del segnale dipendente dal mutante

EGFR. I metodi sono utilizzabili per regolare qualsiasi cascata di trasduzione del segnale in cui il mutante EGFR non è noto o si scopre in seguito che svolge un ruolo. I metodi sono praticati in contesti *in vitro* o in contesti *in vivo* come approccio terapeutico per il trattamento o la prevenzione di malattie caratterizzate da, causate da o associate all'attivazione della cascata di trasduzione del segnale EGFR mutante-dipendente.

Janus chinasi 3 (JAK3)

La Janus chinasi 3 (JAK3) è una tirosin-chinasi che appartiene alla famiglia delle Janus chinasi. Altri membri della famiglia Janus sono JAK1, JAK2 e TYK2. Sono tirosin-chinasi citosoliche specificamente associate ai recettori delle citochine. Poiché le proteine dei recettori delle citochine sono prive di attività enzimatica, dipendono dalle JAK per avviare la segnalazione al momento del legame con i loro ligandi (ad esempio, le citochine). I recettori delle citochine possono essere suddivisi in cinque sottogruppi principali in base ai loro diversi domini e motivi di attivazione. JAK3 è necessaria per la segnalazione dei recettori di tipo I che utilizzano la catena gamma comune (γ_c).

A differenza dell'espressione relativamente

ubiquitaria di JAK1, JAK2 e Tyk2, JAK3 è espressa prevalentemente nei lignaggi ematopoietici come le cellule NK, le cellule T e le cellule B e nelle cellule epiteliali intestinali. JAK3 funziona nella trasduzione del segnale e interagisce con i membri della famiglia STAT (trasduzione del segnale e attivatori della trascrizione). JAK3 è coinvolto nella trasduzione del segnale da parte di recettori che impiegano la catena gamma comune (γ_c) della famiglia dei recettori per le citochine di tipo I (ad esempio IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-15R e IL-21R). Le mutazioni di JAK3 provocano un'immunodeficienza combinata grave (SCID). I topi che non esprimono JAK3 hanno cellule T e B che non rispondono a molte citochine.

Poiché la JAK3 è necessaria per lo sviluppo delle cellule immunitarie, il bersaglio della JAK3 potrebbe essere una strategia utile per generare una nuova classe di farmaci immunosoppressori. Inoltre, a differenza di altre JAK, la JAK3 è espressa principalmente nelle cellule ematopoietiche, quindi un inibitore della JAK3 altamente specifico dovrebbe avere effetti precisi sulle cellule immunitarie e difetti pleiotropici minimi. La selettività di un inibitore di JAK3 avrebbe anche dei vantaggi rispetto

agli attuali farmaci immunosoppressori ampiamente utilizzati, che hanno numerosi bersagli e diversi effetti collaterali. Un inibitore di JAK3 potrebbe essere utile per trattare le malattie autoimmuni, soprattutto quelle in cui un particolare recettore di citochine ha un ruolo diretto nella patogenesi della malattia. Ad esempio, la segnalazione attraverso il recettore IL-15 è nota per essere importante nello sviluppo dell'artrite reumatoide e i recettori per IL-4 e IL-9 svolgono un ruolo nello sviluppo delle risposte allergiche.

Il linfoma natural killer (NK)/T di tipo extranodale e nasale (NKCL) è una neoplasia aggressiva a prognosi infausta in cui, di solito, il trasduttore e attivatore del segnale di trascrizione γ (STAT3) è costitutivamente attivato e oncogeno. È stato dimostrato che l'attivazione di STAT3 deriva principalmente dalla fosforilazione costitutiva della Janus chinasi γ (JAK3) sulla tirosina 980, come osservato in tre delle quattro linee cellulari NKCL testate e in 20 dei 23 campioni di tumore NKCL. In una delle linee cellulari e in 4 dei 19 campioni di tumore primario NKCL, l'attivazione costitutiva di JAK3 era correlata a una mutazione acquisita (A573V o V722I) nel dominio della pseudokinasi di JAK3. Inoltre, è

stato dimostrato che l'attivazione costitutiva della via JAK3/STAT3 ha un ruolo importante nella crescita e nella sopravvivenza delle cellule NKCL e nel fenotipo invasivo. In effetti, la crescita delle cellule NKCL è stata rallentata in vitro colpendo JAK3 con inibitori chimici o small-interfering RNA. In un modello murino di xenotrapianto NKCL umano, la crescita del tumore è stata significativamente ritardata dall'inibitore di JAK3. Pertanto, l'attivazione costitutiva di JAK3, che può derivare da mutazioni che attivano JAK3, è una caratteristica frequente di NKCL e potrebbe essere un bersaglio terapeutico.

I composti qui descritti sono inibitori dell'attività della chinasi JAK3 e hanno un beneficio terapeutico nel trattamento dei disturbi associati all'attività inappropriata di JAK3, in particolare nel trattamento e nella prevenzione degli stati patologici mediati da JAK3. Tali stati patologici comprendono l'artrite reumatoide, la psoriasi e il rigetto dei trapianti d'organo, il linfoma e alcuni tumori solidi.

Composizioni Farmaceutiche, Formulazione e Somministrazione

Per gli usi terapeutici dei composti dell'invenzione, tali composti sono somministrati in quantità terapeuticamente efficaci da soli o come parte di una

composizione farmaceutica. Di conseguenza, vengono fornite nella presente composizioni farmaceutiche, che comprendono almeno un composto dell'invenzione, e uno o più veicoli, diluenti, adiuvanti o eccipienti farmaceuticamente accettabili. Inoltre, tali composti e composizioni sono somministrati singolarmente o in combinazione con uno o più agenti terapeutici aggiuntivi. I metodi di somministrazione di tali composti e composizioni includono, ma non sono limitati a, somministrazione endovenosa, inalazione, somministrazione orale, somministrazione rettale, parenterale, somministrazione intravitreale, somministrazione sottocutanea, somministrazione intramuscolare, somministrazione intranasale, somministrazione dermica, somministrazione topica, somministrazione oftalmica, somministrazione buccale, somministrazione tracheale, somministrazione bronchiale, somministrazione sublinguale o somministrazione ottica. I composti qui forniti sono somministrati mediante formulazioni farmaceutiche note, tra cui compresse, capsule o elisir per la somministrazione orale, supposte per la somministrazione rettale, soluzioni o sospensioni sterili per la somministrazione parenterale o intramuscolare, lozioni, gel, unguenti o creme per la

somministrazione topica e simili.

La quantità terapeuticamente efficace varierà a seconda, tra gli altri, della malattia indicata, della gravità della malattia, dell'età e della salute relativa del soggetto, della potenza del composto somministrato, della modalità di somministrazione e del trattamento desiderato. Il dosaggio richiesto varia anche in base alla modalità di somministrazione, alla particolare condizione da trattare e all'effetto desiderato.

Le forme di sale farmaceuticamente accettabili includono sali acidi/anionici o basici/cationici farmaceuticamente accettabili. I sali acidi/anionici farmaceuticamente accettabili includono acetato, benzenesolfonato, benzoato, bicarbonato, bitartrato, bromuro, edetato di calcio, camsilato, carbonato, cloruro, citrato, diidrocloreuro, edetato, edisilato, estolato, esilato, fumarato, glicato, gluconato, glutammato, glicolilarsanilato, esilresorcinato, idrobromuro, cloridrato, idrossinafato, ioduro, isetionato, lattato, lattobionato, malato, maleato, malonato, mandelato, mesilato, solfato di metile, mucato, napsilato, nitrato, pamoato, pantotenato, fosfato/difosfato, poligalatturonato, salicilato, stearato, subacetato, succinato, solfato,

idrogenosolfato, tannato, tartrato, teoclato, tosilato e trietioduro. I sali basici/cationici farmaceuticamente accettabili includono i sali di sodio, potassio, calcio, magnesio, dietanolamina, N-metil-D-glucamina, L-lisina, L-arginina, ammonio, etanolamina, piperazina e trietanolamina.

Un sale acido accettabile dal punto di vista farmaceutico si forma per reazione della forma base libera di un composto con un acido inorganico o organico adatto, tra cui, ma non solo, acido bromico, cloridrico, solforico, nitrico, fosforico, succinico, maleico, formico, acetico, propionico, fumarico, citrico, tartarico, lattico, benzoico, salicilico, glutammico, aspartico, p-toluensolfonico, benzenesolfonico, metansolfonico, etansolfonico, naftalensolfonico come il 2-naftalensolfonico o l'acido esanoico. Un sale di addizione acida farmaceuticamente accettabile di un composto di Formula (I) può comprendere o essere, ad esempio, un idrobromuro, cloridrato, solfato, nitrato, fosfato, succinato, maleato, formarato, acetato, propionato, fumarato, citrato, tartrato, lattato, benzoato, salicilato, glutammato, aspartato, p-toluensolfonato, benzenesolfonato, metanesolfonato, etanesolfonato, naftalensolfonato (ad esempio, 2-naftalensolfonato) o

sale esanoato.

Le forme di acido libero o di base libera dei composti dell'invenzione possono essere preparate rispettivamente dal corrispondente sale di addizione di base o dalla forma di sale di addizione di acido. Ad esempio, un composto dell'invenzione in forma di sale di addizione acida può essere convertito nella corrispondente forma di base libera trattando con una base adatta (ad esempio, una soluzione di idrossido di ammonio, idrossido di sodio e simili). Un composto dell'invenzione sotto forma di sale di addizione alla base può essere convertito nel corrispondente acido libero mediante trattamento con un acido adatto (ad esempio, acido cloridrico, ecc.).

I derivati dei composti dell'invenzione possono essere preparati con metodi noti agli esperti della tecnica (ad esempio, per ulteriori dettagli vedere Saulnier et al, *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 1994, 4, 1985).

I derivati protetti dei composti dell'invenzione possono essere preparati con mezzi noti agli esperti della tecnica. Una descrizione dettagliata delle tecniche applicabili alla creazione di gruppi protettori e alla loro rimozione si trova in T. W. Greene, "Protecting Groups in Organic Chemistry," 3rd edition, John Wiley and Sons, Inc., 1999. I composti

dell'invenzione possono essere preparati come loro singoli stereoisomeri mediante reazione di una miscela racemica del composto con un agente risolvente otticamente attivo per formare una coppia di composti diastereoisomerici, separando i diastereomeri e recuperando gli enantiomeri otticamente puri. La risoluzione degli enantiomeri può essere effettuata utilizzando derivati diastereomerici covalenti dei composti dell'invenzione o utilizzando complessi dissociabili (ad esempio, sali diastereomerici cristallini). I diastereoisomeri hanno proprietà fisiche distinte (ad esempio punti di fusione, punti di ebollizione, solubilità, reattività, ecc.) e possono essere facilmente separati sfruttando queste diversità. I diastereoisomeri possono essere separati mediante cromatografia o mediante tecniche di separazione/risoluzione basate sulle differenze di solubilità. L'enantiomero otticamente puro viene quindi recuperato, insieme all'agente risolvente, con qualsiasi mezzo pratico che non comporti racemizzazione. Una descrizione più dettagliata delle tecniche applicabili alla risoluzione di stereoisomeri di composti dalla loro miscela racemica si trova in Jean Jacques, Andre Collet e Samuel H. Wilen, "Enantiomers, Racemates and Resolutions", John Wiley

And Sons, Inc., 1981.

Adeguati vettori, diluenti, coadiuvanti o eccipienti farmaceuticamente accettabili per l'uso nelle composizioni farmaceutiche dell'invenzione includono compresse (compresse rivestite) fatte ad esempio di collidone o gommalacca, gomma arabica, talco, biossido di titanio o zucchero, capsule (gelatina), soluzioni (soluzione acquosa o acquosa etanolica), sciroppi contenenti i principi attivi, emulsioni o polveri inalabili (di vari saccaridi come lattosio o glucosio, sali e miscele di questi eccipienti tra loro) e aerosol (soluzioni inalatorie contenenti o meno propellenti). Gli eccipienti che possono essere utilizzati includono, ad esempio, acqua, solventi organici accettabili dal punto di vista farmaceutico come paraffine (ad esempio, frazioni del petrolio), oli vegetali (ad esempio, olio di arachide o di sesamo), alcoli mono o polifunzionali (ad esempio, etanolo o glicerolo), vettori come polveri minerali naturali (ad esempio, caolino, argille, talco, gesso), polveri minerali sintetiche (ad esempio, acido silicico e silicati altamente dispersi), zuccheri (ad esempio, zucchero di canna, lattosio e glucosio), emulsionanti (ad esempio, lignina, liquori di solfito esausti, metilcellulosa, amido e polivinilpirrolidone) e

lubrificanti (ad esempio, magnesio stearato, talco, acido stearico e sodio laurilsolfato).

I composti della Formula (I) possono essere prodotti secondo una varietà di metodi, alcuni dei quali sono noti nella tecnica. Ad esempio, possono essere usati i metodi divulgati nella pubblicazione PCT WO2011/060295, con modifiche adatte, per preparare composti secondo la presente invenzione. Nella presente sono descritti metodi esemplificativi per preparare i composti dell'invenzione, inclusi negli Esempi.

ESEMPI

La presente invenzione è ulteriormente esemplificata dai seguenti esempi che illustrano la preparazione dei composti della Formula (I) secondo l'invenzione. Gli esempi hanno uno scopo puramente illustrativo e non sono intesi, né devono essere interpretati, come una limitazione dell'invenzione. Gli esperti della tecnica si renderanno conto che è possibile apportare variazioni e modifiche senza cambiare la portata dell'invenzione.

Gli spettri di risonanza magnetica nucleare (NMR) e di spettrometria di massa (MS) ottenuti per i composti descritti negli esempi seguenti e quelli descritti nel presente documento sono risultati coerenti con quelli

dei composti delle formule qui riportate.

Metodo di Cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC-MS):

1. I campioni sono stati analizzati su un sistema MSD 6120 di Agilent Technologies con una colonna in fase inversa Zorbax Eclipse XDB-C18 (3,5 μ m) (4,6 x 50 mm) a temperatura ambiente con una velocità di flusso di 1,5 mL/minuto.

2. La fase mobile utilizza il solvente A (acqua/0,1% di acido formico) e il solvente B (acetonitrile/0,1% di acido formico): 95 %/5 % a 0 %/100 % (A/B) per 5 minuti.

3. Gli spettri di massa (m/z) sono stati registrati mediante ionizzazione electrospray (ESI).

4. I dati di ionizzazione sono stati arrotondati al numero intero più vicino.

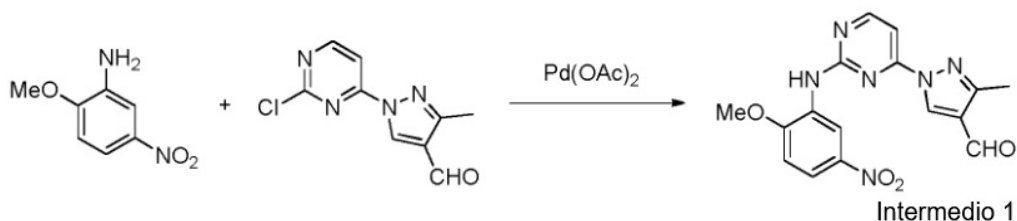
Spettri NMR del protone:

Se non diversamente indicato, tutti gli spettri ^1H NMR sono stati eseguiti su un Varian serie Mercury 300 MHz o su un Bruker 500MHz. Tutti i protoni osservati sono riportati come parti per milione (ppm) di distanza dal tetrametilsilano, utilizzando le abbreviazioni convenzionali per la designazione dei picchi principali: ad esempio, s (singoletto), d (doppietto), t (tripletto), q (quartetto), m (multipletto) e br

(ampio).

Intermedio 1: 1-(2-(2-Metossi-5-nitrofenilammino)pirimidin-4-il)-3-metil-1H-pirazolo-4-carbaldeide

Metodo B



1-(2-Cloropirimidin-4-il)-3-metil-1H-pirazolo-4-carbaldeide (130 mg, 0,59 mmol) è stato aggiunto a una miscela di 2-metossi-5-nitroanilina (88,6 mg, 0,53 mmol), Pd(OAc)₂ (6,5 mmol, 0,029 mmol), (±)-2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftalene (BINAP, 36,5 mg, 0,059 mmol), K₂CO₃ (161,8 mg, 1,17 mmol) in 10 mL di 1,4-diossano (degassato per 20 min prima dell'uso). 1-(2-cloropirimidina-4-il)-3-metil-1H-pirazolo-4-carbaldeide è stata preparata con la procedura nota descritta in WO 2013/109882 A1.

La miscela risultante è stata agitata a 100°C per 5 h e quindi concentrata sotto vuoto. È stata aggiunta acqua fredda e il solido precipitato è stato raccolto per filtrazione, lavato con DCM (5 mL) e asciugato per dare il desiderato Intermedio 1 come solido giallo (0,13 g, 65%); MS (ESI) *m/z* 355.4 [M+H]⁺.

Intermedio 9: 1-(2-(4-fluoro-3-nitrofenilammino)pirimidin-4-il)-3-metil-1H-pirazolo-4-carbaldeide

Usando 4-fluoro-3-nitroanilina e 1-(2-cloropirimidina-4-il)-3-metil-1H-pirazolo-4-carbaldeide, l'Intermedio 9 è stato preparato come descritto nel metodo B; MS (ESI) m/z 343.1 [M+H]⁺.

Intermedio 10: 3-metil-1-(2-(4-morfolino-3-nitrofenilammino)pirimidin-4-il)-1H-pirazolo-4-carbaldeide

Ad una soluzione di Intermedio 9 (200 mg, 0,59 mmol), DIPEA (0,20 mL, 1,17 mmol) in DMAA (10 mL) è stata aggiunta la morfolina (0,076 mL, 0,88 mmol). La miscela di reazione è stata riscaldata a 80°C per 2h. Il solvente è stato rimosso sotto vuoto e la miscela è stata estratta con DCM. La miscela grezza è stata purificata mediante cromatografia su colonna (da 0 a 5% MeOH in DCM) per ottenere l'intermedio desiderato come solido rosso (220,2 mg, 92%); MS (ESI) m/z 410.2 [M+H]⁺.

Intermedio 63: 1-(2-(4-fluoro-2-metossi-5-nitrofenilammino)pirimidin-4-il)-3-fenil-1H-pirazolo-4-carbaldeide

Utilizzando 4-fluoro-2-metossi-5-nitroanilina e 1-(2-cloropirimidin-4-il)-3-fenil-1H-pirazolo-4-

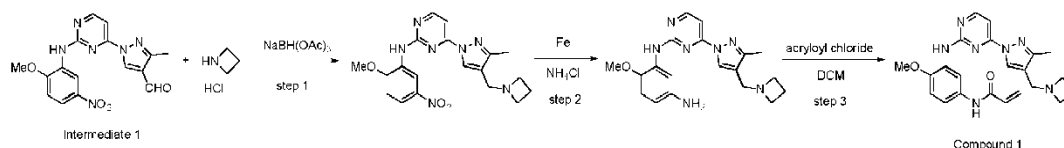
carbaldeide, l'Intermedio 63 è stato preparato come descritto nel metodo B; MS (ESI) m/z 435.1 $[M+H]^+$.

Intermedio 64: 1-(2-(2-metossi-4-morfolino-5-nitrofenilammino)pirimidin-4-il)-3-fenil-1H-pirazolo-4-carbaldeide

Utilizzando l'Intermedio 63, l'Intermedio 64 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'Intermedio 10; MS (ESI) m/z 502.2 $[M+H]^+$.

Esempio 1 (Questo esempio non fa più parte della presente invenzione)

Composto 1: N-(3-(4-(4-(azetidina-1-ilmetil)-3-metil-1H-pirazolo-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossifenil)acrilammide



[cloruro acrilico; fase; intermedio; composto.]

Passaggio 1:

Ad una soluzione di Intermedio 1 (35,0 mg, 0,10 mmol), diisopropiletilammina (DIPEA, 50 μ L, 0,30 mmol) in dimetilacetammide (DMAA, 2 mL) sono stati aggiunti 18,5 mg di azetidina cloridrato (0,20 mmol) a temperatura ambiente. Dopo essere stata agitata per 20 minuti, sono stati aggiunti alla miscela 62,8 mg di triacetossiboroidride di sodio ($\text{NaBH}(\text{OAc})_3$, 0,30 mmol) e la miscela risultante è stata agitata a temperatura

ambiente per 16h. Il solvente è stato evaporato sotto vuoto e la miscela è stata purificata per cromatografia su colonna (da 0 a 10% MeOH in DCM) per dare 4-(4-(azetidino-1-ilmetil)-3-metil-1H-pirazolo-1-il)-N-(2-metossi-5-nitrofenil)pirimidino-2-ammina come solido rosso (32.0 mg, 82%); MS (ESI) m/z 396.2 [M+H]⁺.

Passaggio 2:

A una soluzione del composto nitro di cui sopra (56,0 mg, 0,14 mmol) in 3 mL di miscela di etanolo e acqua (5:1) sono stati aggiunti 78,2 mg di ferro (1,42 mmol) e cloruro di ammonio (38,0 mg, 0,71 mmol). La miscela è stata riscaldata a 80°C per 2h. 2M di soluzione di ammoniacca in MeOH (2mL) è stata aggiunta e la miscela risultante è stata filtrata attraverso Celite. Il filtrato è stato concentrato. Il residuo risultante è stato estratto con DCM, lavato con soluzione di NaHCO₃ sat., salamoia, essiccato su Na₂SO₄ anidro. L'olio grezzo è stato purificato mediante cromatografia su colonna (da 0 a 20% di MeOH in DCM con 0,1% di NH₃) per ottenere N-(4-(4-(azetidino-1-ilmetil)-3-metil-1H-pirazolo-1-il)pirimidino-2-il)-6-metossibenzene-1,3-diammina come solido bianco sporco (38,0 mg, 69%); MS (ESI) m/z 366.2 [M+H]⁺.

Passaggio 3:

Ad una soluzione di anilina (36,0 mg, 0,10 mmol) e

DIPEA (18,8 μL , 0,11 mmol) in DCM (2 mL) è stata aggiunta una soluzione di acrilocloruro (8,01 μL , 0,10 mmol) in DCM (0,2 mL) a -20°C . La miscela è stata agitata per 1 h e calmata con l'aggiunta di una soluzione di NaHCO_3 sat. La miscela è stata estratta con DCM ed essiccata su Na_2SO_4 anidro. La miscela grezza è stata purificata per cromatografia su colonna (da 0 a 10% di MeOH in DCM con 0,1% di NH_3) per ottenere il composto del titolo come solido bianco sporco. (26,9 mg, 65%); MS (ESI) m/z 420.2 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

Esempio 73

Composto 73: N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide

Utilizzando l'Intermedio 64 e la dimetilammina, il composto del titolo è stato preparato come descritto nell'Esempio 1; MS (ESI) m/z 555.3 $[\text{M}+\text{H}]^+$.

^1H NMR: δ ($\text{DMSO}-d_6$), 2.21 ppm (6H, s), 2.85~2.86 ppm (4H, t), 3.46 ppm (2H, s), 3.81~3.83 ppm (4H, t), 3.91 ppm (3H, s), 5.82~6.43 ppm (2H, dd), 6.72~6.76 ppm (1H, dd), 6.96 ppm (1H, s), 7.34~7.35 (1H, d), 7.41~7.43 ppm (1H, t), 7.47~7.50 ppm (2H, t), 8.04~8.05 ppm (2H, d), 8.18 ppm (1H, s), 8.53~8.54 ppm (1H, d), 9.07 ppm (1H, s), 9.15 ppm (2H, s)

Esempio comparativo 1

Composto 146: 4-(3-((dimetilammino)metil)-4-metil-1H-pirrolo-1-il)-N-(3,5-dimetilfenile)pirimidina-2-ammia

Il composto 146 è stato preparato come descritto in US 8626132 B2; MS (ESI) m/z 356.4 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 2

Composto 147: 1-((1-(2-(3,5-dimetilfenilammino)pirimidin-4-il)-3-metil-1H-pirazol-4-il)metil)azetidina-3-olo

Il composto 147 è stato preparato come descritto in US 8626132 B2; MS (ESI) m/z 365.3 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 3

Composto 148: (R)-1-((1-(2-(3,5-dimetil-4-(2-(pirrolidin-1-il)etossi)fenilammino)pirimidin-4-il)-3-metil-1H-pirazol-4-il)metil)pirrolidin-3-olo

Il composto 148 è stato preparato come descritto in US 8626132 B2; MS (ESI) m/z 492.5 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 4

Composto 149: 1-((1-(2-(4-(2-idrossietossi)-3,5-dimetilfenilammino)pirimidin-4-il)-3-metil-1H-pirazolo-4-il)metil)azetidina-3-olo

Il composto 149 è stato preparato come descritto in US 8626132 B2; MS (ESI) m/z 425.4 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 5

Composto 150: 1-((4-metil-1-(2-(2-metilbifenil-4-

ilammino)pirimidin-4-il)-1H-pirrolo-3-il)metil)azetidin-3-olo

Il composto 150 è stato preparato come descritto in US 8626132 B2; MS (ESI) m/z 426.3 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 6

Composto 151: 1-((3-ciclopropil-1-(2-(4-(2-idroetossi)-3,5-dimetilfenilammino)pirimidin-4-il)-1H-pirazol-4-il)metil)azetidin-3-ol

Il composto 151 è stato preparato come descritto in US 8626132 B2; MS (ESI) m/z 451.5 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 7

Composto 152: 4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)-N-(2-metossi-4-morfolino-5-nitrofenil)pirimidin-2-ammina

Utilizzando l'Intermedio 64, il composto 152 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 531.2 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 8

Composto 153: N1-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-il)-6-metossi-4-morfolinobenzene-1,3-diammina

Utilizzando il composto 152, il composto 153 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 501.4 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 9

Composto 154: N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)ma-3-enammide

Utilizzando il composto 153, il composto 154 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 569.3 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 10

Composto 155: (E)-N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolofenil)pent-2-enammide

Utilizzando il composto 153, il composto 155 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 583.3 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 11

Composto 156: (Z)-N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolofenil)es-3-enammide

Utilizzando il composto 153, il composto 157 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 597.3 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 12

Composto 157: N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)propionammide

Utilizzando il composto 153, il composto 157 è stato

preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 557.7 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 13

Composto 158: N-(5-(4-(4-(azetidina-1-ilmetil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)propionamide

Utilizzando il composto 153, il composto 158 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 569.7 [M+H]⁺.

Esempio comparativo 14

Composto 159: N-(5-(4-(4-(azetidina-1-ilmetil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)-2-propionamide

Utilizzando il composto 153, il composto 159 è stato preparato come descritto nella preparazione dell'esempio 1; MS (ESI) m/z 585.6 [M+H]⁺.

SAGGI BIOLOGICI

1. Saggi di Inibizione Chinasi

I composti della presente invenzione sono stati analizzati per misurare la loro capacità di inibire un pannello di chinasi che include SYK, KDR, JAK3 e mutanti di EGFR.

Metodo: Inibizione dell'attività enzimatica di SYK, KDR, JAK3 e della chinasi mutante dell'EGFR

I composti dell'invenzione sono stati inizialmente

diluiti a 10mM in DMSO al 100 % per la conservazione e sono stati trasformati in soluzione tampone di chinasi per creare una concentrazione di composti compresa tra 1uM e 10uM. Le diluizioni seriali dei composti dell'invenzione sono state dispensate nella piastra a 96 pozzetti (Greiner Biosciences™) a 6 µL ciascuna. Come composti di riferimento sono stati utilizzati l'inibitore reversibile di prima generazione Erlotinb e l'inibitore irreversibile Afatinib.

I mutanti umani purificati, SYK, KDR e JAK3 umani troncati, EGFR come del E746-A750, L858R, L858R/T790M e del E746-A750/T790M (Carna Biosciences™), sono stati diluiti in tampone chinasi e aggiunti alle soluzioni di composti e pre-incubati per 30 minuti (mutanti EGFR per 2 ore) a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati aggiunti ATP (Teknova™) in concentrazione ATP approssimativa (1mM per i mutanti EGFR) e soluzione di substrato (Ulight™-TK peptide per SYK, Ulight™-Jak1 per KDR e JAK3, e Ulight™-PolyGT per i mutanti EGFR (PerkinElmer™)) è stata aggiunta (12 µL ciascuno) ai pozzetti contenenti la soluzione del composto e l'enzima e incubata per 1 ora.

Dopo l'incubazione, alla miscela di reazione è stata aggiunta la soluzione di stop composta da EDTA, acqua

e tampone di rilevazione Lance (PerkinElmer™) (12 µL ciascuno) per arrestare la fosforilazione. Dopo l'aggiunta della soluzione di stop e 5 minuti di agitazione, la soluzione di rivelazione contenente l'anticorpo marcato con Europio, l'acqua e il tampone di rivelazione Lance è stata aggiunta (12 µL ciascuno) alla miscela di reazione e incubata nuovamente per 50 minuti.

La fosforilazione del substrato era funzione dell'emissione a 665 nm misurata dopo l'aggiunta della soluzione di rilevazione e 50 minuti di incubazione.

La potenza del composto è stata assegnata come < 20 nM in IC₅₀, da 21 a 200 nM in IC₅₀, da 201 a 1000nM in IC₅₀ e >1000nM in IC₅₀. Il valore di IC₅₀ è stato determinato con GraphPad Prism 5.

Risultato

I composti della Formula (I) hanno mostrato utili proprietà farmacologiche. Come utilizzato nel presente documento, la concentrazione inibitoria semimassimale (IC₅₀) indica l'inibizione del 50% dell'attività chinasica data (ad esempio, 0 % di inibizione nel controllo trattato con nessun inibitore) da parte dei composti della Formula (I). I composti della Formula (I) hanno mostrato vari livelli di inibizione della proteina chinasi indicata sul pannello. Alcuni

composti hanno mostrato una potente inibizione di tutti i mutanti EGFR in esame e una buona selettività nei confronti di altre chinasi, KDR e SYK, come mostrato nelle tabelle da 1 a 5.

Ad esempio, il composto 73 di Formula (I), ovvero N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide, ha dimostrato di inibire potentemente l'attività chinasica di JAK3 e di tutti e quattro i mutanti di EGFR alla concentrazione di 1mM di ATP (< 20nM in IC₅₀) ma di inibire scarsamente quella di SYK e KDR alla concentrazione approssimativa di ATP Km (vedere Tabelle da 1 a 5).

Il composto di riferimento Erlotinib mostra una moderata inibizione nei confronti del mutante EGFR Del E746-A750 e del mutante EGFR L858R (20-200nM in IC₅₀), ma nessuna o scarsa inibizione nei confronti di altri mutanti EGFR, SYK, KDR e JAK3 (>1000nM in IC₅₀). Gli inibitori irreversibili Afatinib hanno mostrato una potente inibizione contro tutti i mutanti EGFR e JAK3 (< 20nM in IC₅₀), ma nessuna o poca inibizione contro SYK e KDR (>1000nM in IC₅₀). Il composto 73 è simile all'inibitore irreversibile Afatinib in termini di potenza contro tutti i mutanti EGFR testati. Tuttavia, a differenza di Afatinib che inibisce sia gli EGFR

mutanti che quelli wildtype, il composto 73, non mostra alcuna o scarsa inibizione nei confronti dell'EGFR wildtype (si vedano Tabella 1, Tabella 2 e FIG. 1), suggerendo che è selettivo nei confronti dell'EGFR wildtype.

Inoltre, l'inibizione potente e selettiva (<20 nM) di JAK3 da parte di indica che potrebbe essere terapeuticamente utile per il trattamento di malattie mediate da JAK3 quali l'artrite reumatoide, le malattie immunitarie, la leucemia, il linfoma e il cancro metastatico.

Tabella 1. La potenza chinastica del mutante EGFR (T790M) da parte dei composti rappresentativi della Formula (I).

Potenza biochimica: < 20 nM, 20-200 nM, 201-1000nM e >1000nM

Composto n.	Mutante EGFR
	T790M
Afatinib	<20
Erlotinib	20-200
73	<20
146	>1000
147	>1000
148	>1000
149	>1000
150	>1000

151	>1000
152	>1000
153	>1000
157	>1000
158	>1000
159	>1000

Tabella 2. I mutanti EGFR con potenza chinastica dei composti rappresentativi della Formula (I).

Potenza biochimica: < 20 nM, 20-200 nM, 201-1000nM e >1000nM

Composto n.	Mutanti EGFR			
	Del19 (E746-A750)	L858R	L858R/T790M	Del19/T790M
Afatinib	<20	<20	<20	<20
Erlotinib	20-200	20-200	>1000	>1000
73	<20	<20	<20	<20
146	>1000	>1000	201-1000	201-1000
147	>1000	>1000	201-1000	>1000
148	>1000	>1000	201-1000	201-1000
149	>1000	>1000	201-1000	>1000
150	>1000	>1000	201-1000	>1000
151	>1000	20-200	20-200	201-1000
152	>1000	>1000	>1000	>1000
153	>1000	>1000	>1000	>1000
156	>1000	>1000	201-1000	20-200
157	>1000	>1000	>1000	>1000
158	>1000	>1000	>1000	>1000
159	>1000	>1000	20-200	20-200

Tabella 3. La potenza chinastica di JAK3 da parte dei composti rappresentativi della Formula (I).

Potenza biochimica: < 20 nM, 20-200 nM, 201-1000nM e
>1000nM

Composto n.	JAK3
Afatinib	>1000
Erlotinib	201-1000
73	<20

Tabella 4. La potenza chinasi di SYK da parte dei
composti rappresentativi della Formula (I).

Potenza biochimica: < 20 nM, 20-200 nM, 201-1000nM e
>1000nM

Composto n.	Syk
Afatinib	>1000
Erlotinib	>1000
73	201-1000
146	20-200
147	20-200
148	201-1000
149	>1000
150	>1000
151	201-1000
152	>1000
153	>1000
156	>1000
157	>1000
158	>1000
159	>1000

Tabella 5. La potenza chinasi di KDR da parte dei
composti rappresentativi della Formula (I).

Potenza biochimica: < 20 nM, 20-200 nM, 201-1000nM e >1000nM

Composto n.	KDR
Afatinib	>1000
Erlotinib	201-1000
73	>1000

2. Saggi di vitalità cellulare

I composti dell'invenzione sono stati testati per i loro effetti su linee cellulari di NSCLC per illustrare l'efficacia dell'invenzione a livello cellulare. L'errata regolazione e, in particolare, la sovra-attivazione dei mutanti EGFR sono state implicate nell'aumento della proliferazione delle linee di NSCLC. Tra queste linee cellulari, la vitalità cellulare del NSCLC PC9 dipende dall'attivazione del mutante EGFR del E746-A750, mentre quella della cellula H1975 dipende dall'attivazione del mutante EGFR L858R/T790M. E la vitalità cellulare di H2073 dipende dal wildtype di EGFR.

Pertanto, la vitalità di PC9 da parte del composto di Formula (I) rappresenta la potenza cellulare del composto di prova contro il mutante EGFR del E746-A750 e quella di H1975 fa quella contro il mutante EGFR L858R/T790M. E quella di H2073 rappresenta la potenza di EGFR wildtype nella linea NSCLC.

Metodo

I composti preparati dell'invenzione e i riferimenti sono stati testati contro H2073, PC9 e H1975 ottenuti dall'American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Questa linea cellulare è stata mantenuta con un terreno del Roswell Park Memorial Institute (RPMI) (GIBCO™) contenente il 10% di siero fetale bovino (FBS; GIBCO™) e 0,05 mM di 2-mercaptoetanololo. Le cellule sono state seminate a 3×10^3 cellule/100 μ L/pozzetto in una piastra di coltura a 96 pozzetti, quindi è stato aggiunto il composto diluito in serie.

Come inibitori di riferimento sono stati utilizzati l'inibitore reversibile di prima generazione Erlotinib e l'inibitore irreversibile Afatinib. Dopo un periodo di incubazione di 72 ore a 37°C, le cellule sono state sottoposte al saggio ATPLite (Promega) per determinare gli effetti citotossici del composto.

La potenza del composto è stata assegnata come < 20 nM in IC₅₀, da 21 a 200 nM in IC₅₀, da 201 a 1000nM in IC₅₀ e >1000 nM in IC₅₀. Il valore di IC₅₀ è stato determinato con GraphPad Prism 5.

Risultato

Come utilizzato nel presente documento, la concentrazione inibitoria semimassimale (IC₅₀) indica il 50% di inibizione della vitalità di una data cellula da parte dei composti della Formula (I).

La Tabella 6 mostra la vitalità cellulare delle cellule mutanti esprimenti EGFR rispetto a quelle esprimenti EGFR di tipo selvatico e fornisce il rapporto di selettività tra le cellule esprimenti EGFR di tipo selvatico e quelle esprimenti EGFR mutante per ciascun composto di prova. I composti della Formula (I) hanno mostrato un potente intervallo di inibizione (<20nM in IC₅₀) nella cellula PC9 e inoltre nella cellula H1975, dove Erlotinib non ha mostrato alcuna potente inibizione. Ad esempio, il composto 73 di Formula (I), ovvero N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide, ha mostrato una potente inibizione sia nella cellula PC9 che nella cellula H1975 ma non nella H2073, mentre l'Afatinib ha mostrato una potente inibizione nella H2073, nella PC9 e nella H1975. A differenza di Afatinib, alcuni composti di questa invenzione hanno mostrato una grande selettività dell'EGFR wildtype a livello cellulare (ad esempio, il composto 73 con una selettività di > 200 volte nella potenza cellulare mostrata nella Tabella 6).

Tabella 6. L'attività antiproliferativa contro H2073, PC9 e H1975 dei composti selezionati di Formula (I).
Potenza cellulare: < 20 nM, 20-200 nM, 201-1000nM e

>1000nM

Confronto di piega (selettività): < 20 pieghe, 20-100 pieghe, 101-200 pieghe e >200 pieghe

Composto n.	Wildtype EGFR	Mutanti EGFR		Selettività rispetto al wildtype	
				Wildtype vs mutante	
	H2073 (nM)	PC9 (nM)	H1975 (nM)	H2073/PC9 (piega)	H2073/H1975 (piega)
Afatinib	20-200	<20	20-200	<20	<20
Erlotinib	>1000	20-200	>1000	20-100	<20
73	>1000	<20	<20	>200	>200
146	>1000	>1000	>1000	<20	<20
147	>1000	>1000	>1000	<20	<20
148	>1000	>1000	>1000	<20	<20
149	>1000	>1000	>1000	<20	<20
151	>1000	>1000	>1000	<20	<20
154	>1000	20-200	201-1000	<20	<20
155	>1000	201-1000	201-1000	<20	<20
156	>1000	>1000	>1000	<20	<20
157	>1000	>1000	>1000	<20	<20
158	>1000	20-200	201-1000	<20	<20
159	>1000	>1000	>1000	<20	<20

3. Analisi Western

I composti preparati dell'invenzione e le referenze sono stati testati per i loro effetti su linee cellulari NSCLC per misurare la potenza molecolare contro il livello di fosforilazione dell'EGFR wildtype e mutante e illustrare la selettività rispetto all'EGFR p-wildtype. Il livello di inibizione della

fosforilazione dell'EGFR mutante nelle linee di NSCLC PC9 e H1975 dovrebbe essere illustrato per capire se è correlato all'efficacia dell'enzima chinasi e alla potenza cellulare del composto. Sulla base di questi risultati, la selettività del composto nei confronti dei mutanti EGFR rispetto all'EGFR wildtype può essere affrontata a livello molecolare fisiologicamente rilevante.

Metodo

Le linee di NSCLC H1299, PC9 e H1975 sono state trattate con le concentrazioni indicate di composti per 4 ore. Come inibitori di riferimento sono stati utilizzati l'inibitore reversibile di prima generazione Erlotinib e l'inibitore irreversibile Afatinib.

Per l'esperimento di attivazione dell'EGFR selvatico, la linea cellulare H1299 è stata trattata contemporaneamente con l'aggiunta di un ligando EGF 3 nM. Le cellule sono state lisate in tampone RIPA (25mM Tris•HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodio desossicolato, 0,1% SDS) contenente cocktail di inibitori di proteasi e fosfatasi (Thermo scientific). Quantità equivalenti di proteine sono state separate con il sistema NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen™) e poi trasferite su membrane di polivinilidene

difluoruro.

Le membrane sono state testate con un anticorpo antifosfo-Y1067 EGFR (Cell Signaling Technology™) e poi strippate con Restore Western Blot Stripping Buffer (Thermo Scientific™). Le membrane sono state nuovamente testate con un anticorpo anti-EGFR o anti-actina (Cell Signaling Technology™) per valutare il controllo di carico. Le membrane sono state visualizzate mediante chemiluminescenza potenziata.

Per calcolare l'inibizione del livello di fosforilazione di p-EGFR wildtype, p-EGFR del E746-A750 e p-EGFR L858R/T790M, l'intensità di ciascuna banda trattata dalla concentrazione indicata di inibitore è stata misurata mediante densitometro per tradurla in valore numerico e il valore numerico di ciascuna intensità è stato confrontato con quello di ciascun controllo di actina alla concentrazione indicata. Il valore di IC₅₀ è stato determinato con GraphPad Prism 5.

Risultato

Come utilizzato nel presente documento, la concentrazione inibitoria semimassimale (IC₅₀) indica l'inibizione del 50% del livello di fosforilazione a Y1068 di ciascuna proteina EGFR (ad esempio, p-EGFR wildtype, p-EGFR del E746-A750 e p-EGFR L858R/T790M)

da parte dei composti di Formula (I).

La Tabella 7 mostra l'inibizione del livello di fosforilazione dell'EGFR mutante rispetto all'EGFR wildtype e fornisce il rapporto di selettività tra wildtype e mutante per ciascun composto in esame.

I composti selezionati della Formula (I), come il composto 73, hanno mostrato una potente inibizione nei confronti di p-EGFR del E746-A750 e p-EGFR L858R/T790M, ma non di p-EGFR wildtype (illustrati nella FIG. 1 e nella Tabella 7), mentre l'Afatinib ha mostrato una potente inibizione nei confronti di p-EGFR wildtype, p-EGFR del E746-A750 e p-EGFR L858R/T790M.

Tabella 7. L'efficacia nel livello di fosforilazione di EGFR wildtype e mutanti da parte di composti rappresentativi di Formula (I)

Potenza molecolare: < 20 nM, 20-200 nM, 201-1000nM e >1000nM

Confronto di piega (selettività): < 20 pieghe, 20-100 pieghe, 101-200 pieghe e >200 pieghe

Composto n.	H1299	PC9	H1975	Selettività rispetto al wildtype	
	p-EGFR wildtype	p-EGFR del 19 (E746- A750)	p-EGFR L858R, T790M	p-wildtype su p-EGFR del19	p-wildtype su p-EGFR L858R, T790M
Erlotinib	>1000	<20	>1000	20-100	n.d.

Afatinib	20-200	<20	<20	20-100	<20
73	201-1000	<20	<20	20-100	20-100

RIVENDICAZIONI

1. Composto che è una forma di idrato di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide
2. Composto che è una forma di idrato o un suo sale farmaceuticamente accettabile di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide.
3. Composto che è un sale farmaceuticamente accettabile di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide e un acido selezionato tra bromidrico, cloridrico, solforico, nitrico, fosforico, succinico, maleico, formico, acetico, propionico, fumarico, citrico, tartarico, lattico, benzoico, salicilico, glutammico, aspartico, p-toluensolfonico, benzensolfonico, metansolfonico, etansolfonico, naftalensolfonico o esanoico.
4. Composto della rivendicazione 2, in cui il sale farmaceuticamente accettabile è un sale di un acido

selezionato tra bromidrico, cloridrico, solforico, nitrico, fosforico, succinico, maleico, formico, acetico, propionico, fumarico, citrico, tartarico, lattico, benzoico, salicilico, glutammico, aspartico, p-toluensolfonico, benzensolfonico, metansolfonico, etansolfonico, naftalensolfonico o esanoico.

5. Composto della rivendicazione 2, che è una forma di idrato di un acido metansolfonico di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide.

6. Composto della rivendicazione 3 che è un sale di acido metansolfonico di N-(5-(4-(4-((dimetilammino)metil)-3-fenil-1H-pirazol-1-il)pirimidin-2-ilammino)-4-metossi-2-morfolinofenil)acrilammide.

7. Composizione farmaceutica comprendente un composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 come ingrediente attivo.

8. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7, per l'uso in terapia.

9. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7, per l'uso nel trattamento di una

malattia o condizione selezionata tra rigetto di allotrapianto, malattia del trapianto contro l'ospite, retinopatia diabetica, neovascolarizzazione coroidale dovuta a degenerazione maculare senile, psoriasi, artrite, osteoartrite, artrite reumatoide, invasione del pannus sinoviale nell'artrite, sclerosi multipla, miastenia grave, diabete mellito, angiopatia diabetica, retinopatia della prematurità, fibrosi, aterosclerosi, ristensosi, malattie autoimmuni, allergie, malattie respiratorie, asma, rigetto da trapianto, infiammazione, trombosi, proliferazione dei vasi retinici, malattia infiammatoria intestinale, morbo di Crohn, colite ulcerosa, malattie ossee, rigetto di trapianti o trapianti di midollo osseo, lupus, pancreatite cronica, cachessia, shock settico, malattie o disturbi cutanei fibroproliferativi e differenziali, malattie del sistema nervoso centrale, malattie neurodegenerative, morbo di Alzheimer, morbo di Parkinson, disturbi o condizioni correlati a danni ai nervi e degenerazione assonale conseguenti a lesioni cerebrali o del midollo spinale, malattie oculari, infezioni virali, malattie cardiache, malattie polmonari, malattie renali e bronchite.

10. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o composizione farmaceutica

secondo la rivendicazione 7, per l'uso nel trattamento di una malattia o condizione selezionata tra cancro, rigetto di allotrapianto, malattia del trapianto contro l'ospite, retinopatia diabetica, neovascolarizzazione coroidale dovuta a degenerazione maculare senile, psoriasi, artrite, osteoartrite, artrite reumatoide, invasione del pannus sinoviale nell'artrite, sclerosi multipla, miastenia grave, diabete mellito, angiopatia diabetica, retinopatia della prematurità, aterosclerosi, ristensosi, asma, rigetto da trapianto, infiammazione, trombosi, malattia infiammatoria intestinale, morbo di Crohn, colite ulcerosa, lupus, pancreatite cronica, morbo di Alzheimer e morbo di Parkinson.

11. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 6 o composizione farmaceutica secondo la rivendicazione 7, per l'uso nel trattamento del cancro.

12. Composto o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 11, in cui il cancro sono emangiomi infantili, carcinoma polmonare non a piccole cellule, carcinoma della vescica, carcinoma della testa e del collo, carcinoma della prostata, carcinoma della mammella, carcinoma dell'ovaio, carcinoma gastrico o pancreatico.

13. Composto o composizione farmaceutica per l'uso secondo la rivendicazione 12, in cui il cancro è carcinoma polmonare non a piccole cellule.

Per traduzione conforme al testo originale

Barzanò & Zanardo S.p.A.

Didascalia delle figure:

FIG. 1

Potenza molecolare contro mutanti di EGFR a livello
cellulare NSCLC; ... wildtype da ...; actina; Afatinib;
Erlotinib; ... da ...

1/1
Figure 1

Molecular potency against EGFR mutant in NSCLC cell level

