

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 2 694 072

"Combinazione di composto inibitore di AKT e di abiraterone per impiego in trattamenti terapeutici"

Genentech, Inc.,

con sede a South San Francisco, CA (Stati Uniti).

\* \* \* \* \*

#### D E S C R I Z I O N E

##### CAMPO DELL'INVENZIONE

L'invenzione riguarda in generale combinazioni farmaceutiche di composti con attività rivolta contro disordini iperproliferativi come il cancro, e che includono composti che inibiscono l'attività AKT-chinasica. L'invenzione riguarda inoltre le combinazioni per l'impiego in una diagnosi o trattamento *in vitro*, *in situ* e *in vivo* di cellule di mammifero, oppure di condizioni patologiche associate.

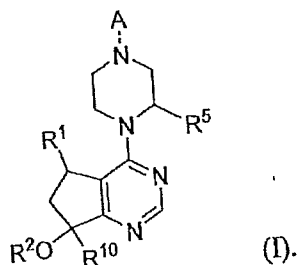
##### SFONDO DELL'INVENZIONE

Le proteinchinasi (PK) sono enzimi che catalizzano la fosforilazione dei gruppi ossidrilici presenti su residui tirosinici, serinici e treoninici di proteine per trasferimento del fosfato (gamma) terminale della ATP. Attraverso vie di trasduzione del segnale, tali enzimi modulano la crescita, la differenziazione e la proliferazione delle cellule, quindi teoricamente tutti gli aspetti della vita cellulare in un modo o in un altro a seconda dell'attività PK (Hardie, G. e Hanks, S. (1995) The Protein Kinase Facts Book, I and II, Academic Press, San Diego, CA). Inoltre, un'anomala attività PK è stata correlata a un insieme di disordini che variano dalle

malattie relativamente non di minaccia per la vita, come per esempio la psoriasi, fino a malattie estremamente virulente come il glioblastoma (cancro al cervello). Le proteinchinasi sono un'importante classe bersaglio per una modulazione terapeutica (Cohen, P. (2002) Nature Rev. Drug Discovery 1:309).

La pubblicazione di domanda di brevetto internazionale WO 2008/006040 riguarda una serie di inibitori di AKT di formula I:

Carver et al. (Cancer Cell 19, 575-586, 2011) riguarda l'inibizione farmacologica contemporanea di PI3K e di vie recettoriali degli androgeni (due vie oncogeniche a regolazione incrociata) tali da causare quasi una totale regressione del cancro alla prostata. Le pubblicazioni di domanda di brevetto internazionale WO 2008/006040 e US 2008/0051399 rivelano una serie di inibitori di AKT di formula I:



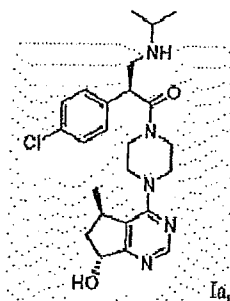
Attualmente, permane la richiesta di metodi migliori e composizioni che possono essere utilizzate per trattare malattie iperproliferative come il cancro.

#### RIASSUNTO DELL'INVENZIONE

E' stato determinato che effetti additivi o sinergici nell'inibizione della crescita di cellule cancerose *in vitro* e *in vivo* possono essere raggiunti grazie alla somministrazione di un

composto di formula I o di un suo sale farmaceuticamente accettabile in combinazione ad alcuni altri specifici agenti chemioterapici. Le combinazioni e i metodi possono essere utili nel trattamento di disordini iperproliferativi come il cancro.

Un aspetto dell'invenzione fornisce un composto di formula Ia



in combinazione a abiraterone per l'impiego nel trattamento del cancro alla prostata.

Il composto di formula Ia e abiraterone possono essere co-formulati per la somministrazione in una combinazione in quanto composizione farmaceutica, altrimenti possono essere somministrati separatamente alternati (in sequenza) in quanto combinazione terapeutica.

Viene anche descritto un corredo comprendente un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile, un contenitore, un foglietto illustrativo o una etichetta che indichi la somministrazione del composto di formula I o un suo sale farmaceuticamente accettabile insieme ad abiraterone per il trattamento del cancro alla prostata.

Un aspetto dell'invenzione fornisce un prodotto comprendente un composto avente formula Ia e abiraterone in quanto preparazione

combinata per un impiego separato, simultaneo oppure in sequenza nel trattamento del cancro alla prostata.

Oltre a fornire un trattamento migliore per un dato disordine iperproliferativo, la somministrazione di alcune combinazioni dell'invenzione può migliorare la qualità di vita per un paziente rispetto alla qualità di vita provata dallo stesso paziente che riceva un trattamento differente. Per esempio, la somministrazione in un paziente di una combinazione di un composto di formula Ia e abiraterone come qui descritto può dare una migliore qualità di vita rispetto alla qualità di vita di un paziente che abbia ricevuto come terapia solamente l'agente chemioterapico. Per esempio, la terapia combinata con la combinazione qui descritta può abbassare la dose di agenti chemioterapici necessari, in questo modo diminuendo gli effetti collaterali associati ad agenti chemioterapici a dosi elevate (per esempio nausea, vomito, perdita di capelli, arrossamento, perdita di appetito e perdita di peso, ecc.). La combinazione può inoltre provocare ridotto carico tumorale ed eventi avversi associati come ad esempio dolore, disfunzione di organo, perdita di peso, ecc. Di conseguenza, un aspetto dell'invenzione fornisce un composto di formula Ia per un impiego terapeutico volto a migliorare la qualità di vita di un paziente trattato per il cancro alla prostata con abiraterone.

#### BREVE DESCRIZIONE DEI DISEGNI

La figura 1 illustra i dati per il composto di formula Ia (GDC-0068) dosato PO + abiraterone in tumori prostatici primari

LuCaP35V.

La figura 2 illustra i dati per il composto di formula Ia (GDC-0068) dosato PO + abiraterone in tumori prostatici primari DU-145.x1.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DI FORME DI REALIZZAZIONE RAPPRESENTATIVE E  
DEFINIZIONI

Le parole "comprendono", "comprendenti", "includono", "inclusi" e "include", quando utilizzate in tale specificazione e rivendicazioni, vogliono specificare la presenza di caratteristiche stabilite, elementi, componenti o fasi, anche se non precludono la presenza o l'addizione di una o più altre caratteristiche, elementi, componenti, fasi o gruppi.

L'attività di terapie anti-androgeniche, incluse bicalutamide agonista di GnRH e abiraterone, ha dato come risultato una migliore sopravvivenza per pazienti con cancro alla prostata. In ogni caso, quasi tutti i pazienti che presentano cancro alla prostata avanzato ormono-sensibile progrediscono a CRPC e richiedono altre forme di terapia. L'attivazione di una segnalazione PI3K/Akt, spesso manifestata con perdita di PTEN, è una frequente caratteristica peculiare di CRPC. Una deregolazione di questa via porta come risultato all'attivazione di bersagli a valle (per esempio, PRAS40, MTOR, GSK3b, FOXO, ecc.) coinvolti nella sopravvivenza, proliferazione, nel progredire del ciclo cellulare, nella crescita, migrazione ed angiogenesi. Come dato da evidenziare, una delezione prostata-specifica di PTEN in modelli murini ricapitola fedelmente le

caratteristiche di un cancro prostatico umano, e la delezione di Akt 1 in un modello di disattivazione di Pten condizionale riduce significativamente i cancri alla prostata (Chen et al. 2006; Guertin et al. 2009; Nardella et al. 2009). Inoltre la delezione di Pten favorisce indipendenza dagli androgeni in linee cellulari e modelli murini di cancro alla prostata (Gao et al. 2006; Jiao et al. 2007). In pazienti con cancro alla prostata, la perdita di PTEN è associata a punteggi Gleason più elevati, post-prostectomia da recidiva, metastasi ossea, e progredire in castrato-resistenza. Inoltre, la perdita di PTEN è associata a una diminuzione in sopravvivenza totale. Tutti assieme, tali risultati suggeriscono che l'attivazione della via PI3K/Akt è un importante elemento di avviamento al cancro alla prostata.

Gli ultimi dati non clinici suggeriscono che un dialogo specifico tra le vie AR e PI3K/Akt avviene in CRPC PTEN-carente. Nello specifico, l'attivazione della via PI3K/Akt è associata a una segnalazione androgenica repressa, e l'inibizione della via PI3K/Akt ripristina la segnalazione AR in cellule prostatiche PTEN-carenti. I meccanismi proposti per tener conto di tali osservazioni includono un'inibizione di PI3K/Akt risultante in un'attivazione retroattiva di AR attraverso la up-regolazione (regolazione positiva) di chinasi HER e l'inibizione di AR, il che allevia l'inibizione retroattiva di Akt da parte della fosfatasi PHLPP (Carver et al. 2011). Questa cooperatività reciproca tra le vie PI3K/Akt e AR suggerisce che l'inibizione di solamente una via porterebbe a un'efficacia clinica

sub-ottimale. Pertanto, l'inibizione combinata delle vie AR e PI3K/Akt può portare come risultato a una più completa estinzione della vitalità delle cellule tumorali e a un beneficio clinico di più lunga durata.

Il termine "trattare" e "trattamento" indica entrambi il trattamento terapeutico e le misure di profilassi o prevenzione, dove lo scopo è quello di prevenire o rallentare (diminuire) un cambiamento fisiologico indesiderato o disordine come per esempio la crescita, lo sviluppo o la diffusione di un cancro. Per gli scopi di tale invenzione, risultati clinici utili o desiderati includono, pur senza limitazioni, l'alleviamento dei sintomi, la diminuzione del grado della malattia, lo stato stabilizzato (quindi non in fase di peggioramento) della malattia, il ritardare o rallentare il progredire della malattia, il miglioramento o la palliazione dello stato patologico, e la remissione (che sia parziale o totale, sia rivelabile o non rivelabile). Per "trattamento" si può anche intendere il prolungamento della sopravvivenza rispetto alla sopravvivenza prevista se non si riceve trattamento. Le persone in necessità di trattamento includono quelle già con la condizione o il disordine così come quelle propense ad avere la condizione o il disordine, oppure quelle nelle quali si debbano prevenire la condizione o il disordine.

L'espressione "quantità terapeuticamente efficace" indica una quantità di un composto della presente invenzione che (i) tratta la determinata malattia, condizione, o disordine, (ii) attenua, migliora

o elimina uno o più sintomi della determinata malattia, condizione o disordine, oppure (iii) previene o ritarda l'insorgenza di uno o più sintomi della determinata malattia, condizione o disordine qui descritti. Nel caso di un cancro, la quantità terapeuticamente efficace del farmaco può ridurre il numero di cellule cancerose; ridurre la misura del tumore; inibire (quindi rallentare fino a un certo grado e preferibilmente fermare) l'infiltrazione delle cellule tumorali in organi periferici; inibire (quindi rallentare fino a un certo grado e preferibilmente arrestare) la metastasi tumorale; inibire, fino a un certo grado, la crescita tumorale; e/o alleviare fino a un certo grado uno o più tra i sintomi associati al cancro. Fino al grado in cui il farmaco possa prevenire la crescita e/o uccidere le cellule cancerose presenti, questo potrà essere citostatico e/o citotossico. Per una terapia del cancro, l'efficacia può essere misurata per esempio stabilendo il tempo per il progredire della malattia (time to disease progresisone (TTP)) e/o determinando l'indice di risposta (response rate (RR)).

I termini "cancro" e "canceroso" indicano o descrivono la condizione fisiologica nei mammiferi che è tipicamente caratterizzata da una crescita cellulare non regolata. Un "tumore" comprende una o più cellule cancerose. Esempi di cancro includono, pur senza limitazioni, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma e leucemia o malattie linfatiche maligne. Esempi più particolari di simili cancri includono cancro alle cellule squamose (per esempio cancro epiteliale a cellule squamose), cancro polmonare incluso cancro polmonare a

cellule piccole oppure cancro polmonare a cellule non-piccole ("NSCLC"), adenocarcinoma del polmone e carcinoma squamoso del polmone, cancro del peritoneo, cancro epatocellulare, cancro gastrico allo stomaco incluso cancro gastrointestinale, cancro pancreatico, glioblastoma, cancro al collo dell'utero, cancro ovarico, cancro epatico, cancro alla vescica, epatoma, cancro mammario, cancro al colon, cancro al retto, cancro al colon-retto, carcinoma all'endometrio oppure uterino, carcinoma alle ghiandole salivari, cancro al rene o renale, cancro prostatico, cancro vulvare, cancro tiroideo, carcinoma epatico, carcinoma anale, carcinoma al pene, così come cancro a testa e collo. Il cancro gastrico, come qui utilizzato, include cancro allo stomaco che può svilupparsi in qualsiasi parte dello stomaco oppure può diffondersi in tutto lo stomaco ed altri organici, in particolare esofago, polmoni, linfonodi e fegato.

Un "agente chemioterapico" è un composto biologico (a grossa molecola) oppure chimico (a piccola molecola) utile nel trattamento di un cancro, indipendentemente dal meccanismo d'azione. Classi di agenti chemioterapici includono, pur senza limitazioni: agenti alchilanti, antimetaboliti, alcalodi di piante veleno sespindle poison, antibiotici citotossici/antitumorali, inibitori di topoisomerasi, proteine, anticorpi, fotosensibilizzanti e inibitori chinasici. Agenti chemioterapici includono composti utilizzati in una "terapia mirata" e in una convenzionale chemioterapia non-mirata. Il termine "mammifero" include, pur senza limitazioni, uomo, topi, ratti, cavie, scimmie, cani, gatti, cavalli, bovini, suini, ovini e

volatili.

Il termine "foglietto illustrativo" è utilizzato per indicare le istruzioni solitamente incluse in confezioni commerciali di prodotti terapeutici che contengono le informazioni riguardanti le indicazioni, l'utilizzo, il dosaggio, la somministrazione, le controindicazione e/o avvertenze legate all'impiego di simili prodotti terapeutici.

Un "solvato" indica un'associazione fisica o complesso tra uno o più molecole solventi e un composto dell'invenzione. I composti possono trovarsi in forma non solvatata così come solvatata. Esempi di solventi che formano solvati includono, pur senza limitazioni, acqua, isopropanolo, etanolo, metanolo, DMSO, etilacetato, acido acetico, e etanolamina. Il termine "idrato" indica il complesso in cui la molecola solvente è acqua. Questa associazione fisica implica gradi variabili di legami ionici e covalenti, inclusi i ponti a idrogeno. In alcuni casi, il solvato sarà capace di isolamento, per esempio quando una o più molecole solventi sono incorporate nel reticolo cristallino del solido cristallino. La preparazione di solvati è generalmente risaputa, per esempio in M. Caira et al., J. Pharmaceutical Sci., 93(3), 601-611 (2004). Preparazioni analoghe di solvati, emisolvati, idrati e simili sono descritti da E.C. Van Tonder et al., AAPS PharmSciTech., (5(1), articolo 12 (2004); e A.L. Bingham et al., Chem. Commun., 603-604 (2001). Un tipico processo non-restrittivo comporta il dissolvimento del composto della invenzione in quantità opportune del solvente indicato (organico

oppure acqua oppure loro miscele) a una temperatura più elevata dell'ambiente, e il raffreddamento della soluzione a una velocità sufficiente per poter formare dei cristalli che sono poi isolati per mezzo di metodi standard. Tecniche analitiche, come per esempio la spettroscopia I.R., evidenziano la presenza del solvente (o di acqua) nei cristalli in quanto solvato (oppure idrato).

Il termine "sinergico" come qui utilizzato indica una combinazione terapeutica che sarà più efficace degli effetti additivi di uno o più singoli agenti. Una determinazione di un'interazione sinergica tra un composto di formula Ia e abiraterone può basarsi sui risultati ottenuti dalle analisi qui descritte. I risultati di tali analisi possono essere analizzati utilizzando il metodo combinato di Chou e Talalay e l'analisi di Dose-Effetto con software CalcuSyn in modo da ottenere un Indice di Combinazione (Chou e Talalay, 1984, Adv. Enzyme Regul. 22:27-55). Le combinazioni fornite con tale invenzione sono state valutate in parecchi sistemi di analisi, e i dati possono essere analizzati utilizzando un programma standard per quantificare la sinergia, l'additivismo e l'antagonismo tra i diversi agenti anticancro. Il programma utilizzato è quello descritto da Chou e Talalay, in "New Avenues in Developmental Cancer Chemotherapy", Academic Press, 1987, Capitolo 2. Valori dell'Indice di Combinazione minori di 0,8 indicano sinergia, valori maggiori di 1,2 indicano antagonismo, e valori tra 0,8 e 1,2 indicano effetti additivi, La terapia combinata può produrre "sinergia" e dimostrarsi "sinergica", cioè l'effetto raggiunto quando i principi attivi utilizzati assieme

è maggiore della somma degli effetti che risulta dall'impiego separato dei composti. Un effetto sinergico si può ottenere quando i principi attivi sono: (1) co-formulati e somministrati oppure dati contemporaneamente in una formulazione combinata a dosaggio unitario; (2) dati in alternanza o in parallelo con formulazioni separate; oppure (3) attraverso qualsiasi altro regime. Quando sono dati in una terapia alternata, un effetto sinergico si può ottenere quando i composti sono somministrati o dati in sequenza, per esempio con iniezioni differenti in siringhe separate. In generale, durante una terapia alternata, un dosaggio efficace di ogni principio attivo è somministrato in sequenza, cioè in serie, mentre in una terapia combinata, dosaggi efficaci di due o più principi attivi sono somministrati assieme. In alcuni esempi, gli effetti combinati sono valutati utilizzando entrambi il modello di indipendenza BLISS e il modello a singolo agente maggiore (highest singleagent (HSA)) (Lehár et al. 2007, Molecular Systems Biology 3:80). Punteggi BLISS quantificano il grado di potenziamento derivante da singoli agenti, e un punteggio BLISS > 0 suggerisce più che una semplice additività. Un punteggio HSA > 0 suggerisce un effetto combinato maggiore del massimo delle risposte del singolo agente alle corrispondenti concentrazioni.

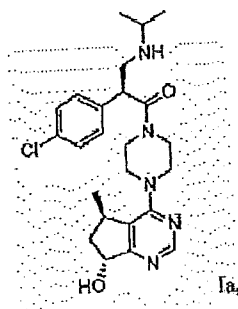
In un aspetto, l'invenzione fornisce un composto di formula Ia in combinazione a abiraterone che fornisce un effetto sinergico nel trattamento del cancro alla prostata. In un ulteriore aspetto, l'effetto sinergico ha un valore di Indice di Combinazione minore di

circa 0,8.

In un aspetto, GDC-0068 o un suo sale è somministrato in combinazione ad abiraterone (e anche opzionalmente in una combinazione con prednisone o prednisolone) per trattare il cancro alla prostata. In un altro esempio, il cancro è un cancro prostatico metastatico. In un esempio, il cancro è adenocarcinoma prostatico.

FORMULA Ia

Composti di formula Ia includono un composto di formula Ia:



#### PREPARAZIONE DI COMPOSTI DI FORMULA I

I composti di questa invenzione possono essere sintetizzati per mezzo di vie di sintesi che includono processi analoghi a quelli risaputi nelle arti chimiche, in particolare alla luce della descrizione qui contenuta. I materiali di partenza generalmente sono disponibili da fonti commerciali come per esempio la Aldrich Chemicals (Milwaukee, W), altrimenti si preparano facilmente utilizzando metodi risaputi dalle persone esperte nel campo (per esempio, preparati per mezzo di metodi generalmente descritti in Louis F. Fieser e Mary Fieser, Reagents for Organic Synthesis, v. 1-19, Wiley, N.Y. (1967-1999 ed.), oppure nel manuale di chimica organica Beilsteins Handbuch der organischen Chemie, 4, Aufl. ed.

Springer-Verlag, Berlino, inclusi i supplementi). Sintesi del composto di formula Ia è descritta in esempio 2.

#### METODI DI SEPARAZIONE

In uno dei metodi di sintesi per la preparazione di composti di formula Ia, può essere utile separare i prodotti di reazione l'uno dall'altro e/o dai materiali di partenza. I prodotti opportuni di ogni fase o serie di fasi sono separati e/o purificati fino a un grado utile di omogeneità per mezzo di tecniche consuete nel campo. Tipicamente, simili separazioni comportano l'estrazione multifasica, la cristallizzazione da un solvente o da una miscela di solventi, la distillazione, la sublimazione oppure la cromatografia. La cromatografia può comportare diversi metodi che includono per esempio: strumenti e metodi cromatografici a fase inversa e a fase normale; ad esclusione di grandezza; a scambio ionico; di cromatografia liquida ad alta, media e bassa pressione; cromatografia analitica su piccola scala; su letto mobile simulato (simulated moving bed (SMB)) e preparativa su strato sottile oppure spesso, così come tecniche di cromatografia rapida e su strato sottile su piccola scala.

Un'altra classe di metodi separativi comporta il trattamento di una miscela di reazione insieme a un reagente selezionato perché si legni o altrimenti renda separabile un opportuno prodotto, materiale di partenza non reagito, una reazione da parte del prodotto, o simili. Tali reagenti includono adsorbenti oppure assorbenti come per esempio carbonio attivo, setacci molecolari, mezzi scambiatori di

ioni, o simili. In alternativa, i reagenti possono essere acidi nel caso di un materiale basico, basi nel caso di un materiale acido, reagenti leganti quali anticorpi, proteine di legame, chelanti selettivi come ad esempio eteri corona, reagenti di estrazione ionica su liquido/liquido (LIX), o simili.

La scelta degli appropriati metodi di separazione dipende dalla natura dei materiali implicati. Per esempio, dal punto di ebollizione e peso molecolare in distillazione sublimazione, dalla presenza o assenza di gruppi funzionali polari in una cromatografia, dalla stabilità dei materiali acidi e basici in un'estrazione multifasica, e simili. Una persona esperta nel campo applicherà le tecniche che più verosimilmente ottengano la separazione indicata.

Le miscele diastereomeriche possono essere separate nei loro singoli diastereomeri sulla base di loro differenze chimico-fisiche per mezzo di metodi risaputi agli esperti nel campo, ad esempio mediante cromatografia e/o cristallizzazione frazionata. Gli enantiomeri possono essere separati per conversione della miscela enantiomerica in una miscela diastereomerica per reazione con un appropriato composto otticamente attivo (per esempio un agente di ausilio chirale come un alcol chirale o un acido cloruro di Mosher), separando i diastereomeri e convertendo (per esempio idrolizzando) i singoli diastereoisomeri nei corrispondenti enantiomeri puri. Inoltre, alcuni dei composti della presente invenzione possono essere atropisomeri (per esempio biarili sostituiti) e sono ritenuti parte di tale invenzione. Gli enantiomeri possono anche essere separati

attraverso l'impiego di una colonna per HPLC chirale.

Un singolo stereoisomero, per esempio un enantiomero sostanzialmente privo del suo stereoisomero, si può ottenere per risoluzione della miscela racemica utilizzando un metodo come per esempio la formazione di diastereomeri con l'impiego di agenti di risoluzione otticamente attivi (Eliel, E. e Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., New York, 1994; Lochmuller, C. H., J. Chromatogr., (1975) 113(3):283-302). Miscele racemiche di composti chirali dell'invenzione si possono separare ed isolare con un qualsiasi metodo appropriato che include: (1) formazione di sali diastereomerici ionici insieme a composti chirali, e separazione mediante cristallizzazione frazionata o altri metodi, (2) formazione di composti diastereomerici insieme ad agenti derivatizzanti chirali, separazione dei diastereomeri, e conversione negli stereoisomeri puri, e (3) separazione degli stereoisomeri arricchiti oppure sostanzialmente puri, direttamente in condizioni chirali. Si veda: "Drug Stereochemistry, Analytical Methods and Pharmacology", Irving W. Wainer, Ed., Marcel Dekker, Inc., New York (1993).

Con il metodo (1), sali diastereomerici si possono formare per reazione di basi chirali enantiomericamente pure come per esempio brucina, chinina, efedrina, stricnina,  $\alpha$ -metil- $\beta$ -fenilettilammina (anfetamina), e simili, insieme a composti asimmetrici recanti una funzionalità acida, ad esempio acido carbossilico e acido solfonico. I sali diastereomerici possono essere indotti a separarsi mediante

crystallizzazione frazionata oppure cromatografia ionica. Per la separazione degli isomeri ottici di composti amminici, l'addizione di acidi carbossilici o solfonici chirali, come ad esempio acido canforsolfonico, acido tartarico, acido mandelico oppure acido lattico, può portare come risultato alla formazione dei sali diastereomerici.

In alternativa, con il metodo (2), il substrato da risolvere viene fatto reagire con un solo enantiomero di un composto chirale in modo da formare una coppia diastereomerica (Eliel, E. e Wilen, S. "Stereochemistry of Organic Compounds", John Wiley & Sons, Inc., 1994, pag. 322. Composti diastereomerici si possono formare lasciando reagire composti asimmetrici insieme a reagenti derivatizzanti chirali enantiomericamente puri, ad esempio derivati mentilici, seguito da separazione dei diastereomeri e idrolisi in modo da ottenere l'enantiomero arricchito o puro. Un metodo per determinare la purezza ottica comporta la produzione di esteri chirali, ad esempio un estere mentilico, per esempio, (-)mentilcloroformiato in presenza di una base, oppure estere di Mosher,  $\alpha$ -metossi- $\alpha$ -(trifluorometil)fenilacetato (Jacob III.J. Org.Chem., (1982) 47: 4165), della miscela racemica, e l'analisi dello spettro  $^1\text{H-NMR}$  per la presenza dei due enantiomeri o diastereomeri atropisomerici. Diastereomeri stabili di composti atropisomerici possono essere separati ed isolati attraverso una cromatografia a fase normale e inversa, seguendo metodi utili alla separazione di naftil-isochinoline atropisomeriche (WO 96/15111). Con il metodo (3), una

miscela racemica di due enantiomeri può essere separata mediante cromatografia utilizzando una fase stazionaria chirale ("Chiral Liquid Chromatography" (1989) W.J. Lough, Ed., Chapman and Hall, New York; Okamoto, J. of Chromatogr., (1990) 513:375-378). Enantiomeri arricchiti o purificati possono essere distinti per mezzo di metodi utilizzati per distinguere altre molecole chirali insieme ad atomi di carbonio asimmetrici, ad esempio per mezzo della rotazione ottica o del dicroismo circolare.

#### AGENTI CHEMIOTERAPICI

Alcuni agenti chemioterapici hanno dimostrato proprietà sorprendenti e inaspettate in combinazione a un composto di formula I o un suo sale farmaceuticamente accettabile nell'inibizione della proliferazione cellulare *in vitro* e *in vivo*. Tali agenti chemioterapici includono abiraterone.

Abiraterone (CAS Reg. No. 154229-19-3; si vedano US 5.604.213 e 5.618.807), e il suo profarmaco abiraterone acetato, è un farmaco in fase di studio per l'utilizzo nel cancro alla prostata castrazione-resistente. Blocca la formazione di testosterone inibendo CYP17A1 (CYP450c17), un enzima anche noto come 17 $\alpha$ -idrossilasi/17,20 liasi. Questo enzima è coinvolto nella formazione di DHEA e androstenedione che può alla fine essere metabolizzato in testosterone. L'abiraterone ha il nome (chimico) (3S,8R,9S,10R,13S,14S)-10,13-dimetil-17-(piridin-3-il)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15-dodecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-olo. Può anche essere somministrato come farmaco acetato, (3S,8R,9S,10R,13S,14S)-10,13-dimetil-17-(piridin-3-il)-2,3,4,7,8,9,10,

11,12,13,14,15-dodecaidro-1H-ciclopenta[a]fenantren-3-il-acetato.

#### COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE

Composizioni farmaceutiche o formulazioni della presente invenzione includono combinazioni di formula Ia, abiraterone, e di uno o più tra un veicolo, un agente di scorrimento, diluente o eccipiente farmaceuticamente accettabili.

I composti di formula Ia, e gli agenti chemioterapici della presente invenzione possono trovarsi nella forma non solvatata così come in quella solvatata insieme a solventi farmaceuticamente accettabili come acqua, etanolo, e simili, e si intende che l'invenzione comprenda entrambe le forme solvatata e non solvatata.

I composti di formula Ia, e l'abiraterone della presente invenzione, possono anche trovarsi in forme tautomeriche differenti, e tutte queste forme sono comprese nell'ambito dell'invenzione. Il termine "tautomero" oppure "forma tautomerica" indica isomeri strutturali ad energie differenti che sono interconvertibili attraverso una barriera bassa in energia. Per esempio, i tautomeri protonici (anche noti come tautomeri prototropici) includono interconversioni attraverso la migrazione di un protone, come per esempio isomerizzazioni cheto-enoliche ed immino-enamminiche. I tautomeri di valenza includono interconversioni per riorganizzazione di alcuni degli elettroni di legame.

Le composizioni farmaceutiche comprendono sia la composizione in massa sia le singole unità di dosaggio costituite da più di un principio farmaceuticamente attivo (per esempio due) che include un

composto di formula Ia e abiraterone, insieme a eccipienti, diluenti, veicoli o agenti di scorrimento farmaceuticamente inattivi. La composizione in massa e ogni singola unità di dosaggio possono contenere quantità prestabilite degli agenti farmaceuticamente attivi appena menzionati. La composizione in massa è un materiale che non si sia ancora formato in singole unità di dosaggio. Una unità di dosaggio illustrativa è una unità di dosaggio orale come per esempio tavolette, pillole, capsule, e simili.

Le composizioni farmaceutiche comprendono anche composti della presente invenzione marcati con isotopi che saranno identici a quelli qui esposti, ma che per il fatto che uno o più atomi sono sostituiti da un atomo con massa atomica o numero di massa differente dalla massa atomica o numero di massa solitamente presente in natura. Tutti gli isotopi di un determinato atomo o elemento come specificato sono contemplati nell'ambito dei composti dell'invenzione e dei loro utilizzi. Isotopi rappresentativi che possono essere incorporati nei composti includono isotopi di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, fosforo, zolfo, fluoro, cloro e iodio, come ad esempio  $^2\text{H}$ ,  $^3\text{H}$ ,  $^{11}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{15}\text{O}$ ,  $^{17}\text{O}$ ,  $^{18}\text{O}$ ,  $^{32}\text{P}$ ,  $^{33}\text{P}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{36}\text{Cl}$ ,  $^{123}\text{I}$  e  $^{125}\text{I}$ . Alcuni composti della presente invenzione marcati con isotopi (per esempio quelli marcati con  $^3\text{H}$  e  $^{14}\text{C}$ ) sono utili in analisi sulla distribuzione nei tessuti di un composto e/o substrato. Gli isotopi triziati ( $^3\text{H}$ ) e del carbonio-14 ( $^{14}\text{C}$ ) sono utili per la loro facilità di preparazione e rintracciabilità. Inoltre, la sostituzione con isotopi più pesanti, come ad esempio il deuterio ( $^2\text{H}$ ) può produrre alcuni vantaggi

terapeutici derivanti da una maggiore stabilità metabolica (per esempio, aumentato tempo di dimezzamento *in vivo* oppure minori richieste di dosaggio) e quindi possono essere in alcuni casi preferibili. Gli isotopi ad emissione di positroni come per esempio  $^{15}\text{O}$ ,  $^{13}\text{N}$ ,  $^{11}\text{C}$  e  $^{18}\text{F}$  sono utili per gli studi di tomografia ad emissione di positroni (PET) volti ad esaminare l'occupazione di recettori di substrato. I composti della presente invenzione marcati con isotopi si possono generalmente preparare attraverso le seguenti procedure analoghe a quelle rivelate negli schemi e/o esempi qui sotto, per sostituzione di un reagente marcato isotopicamente con un reagente marcato non-isotopicamente.

Composti di formula Ia ed agenti chemioterapici sono formulati secondo la pratica farmaceutica standard per l'impiego in una combinazione terapeutica per il trattamento terapeutico (incluso il trattamento di profilassi di disordini iperproliferativi in mammiferi incluso l'uomo).

Appropriati veicoli, diluenti ed eccipienti sono risaputi alle persone esperte nel campo e questi includono materiali quali carboidrati, cere, polimeri idrosolubili e/o voluminizzanti, materiali idrofili e idrofobi, gelatina, oli, solventi, acqua e simili. Il determinato veicolo, diluente o eccipiente utilizzato dipenderà dai mezzi e dallo scopo per il quale venga applicato il composto della presente invenzione. I solventi generalmente sono selezionati in base a solventi riconosciuti dalle persone esperte nel campo come sicuri (GRAS) per essere somministrati in un mammifero. In

generale, solventi sicuri sono solventi acquosi non-tossici come acqua ed altri solventi non-tossici che sono solubili o miscibili in acqua. Appropriati solventi acquosi includono acqua, etanolo, propilene glicole, polietilene glicoli (per esempio, PEG 400, PEG 300), ecc., e loro miscele. Le formulazioni possono anche includere uno o più tamponi, agenti stabilizzanti, tensioattivi, agenti idratanti, agenti lubrificanti, emulsificanti, agenti di sospensione, conservanti, antiossidanti, agenti opacizzanti, agenti di scorrimento, sussidi di processamento, coloranti, edulcoranti, agenti profumanti, agenti aromatizzanti ed altri noti additivi utili per dare una presentazione lucida del farmaco (quindi un composto della presente invenzione o una composizione farmaceutica) oppure un sussidio nella fabbricazione del prodotto farmaceutico (cioè, medicinale).

Le formulazioni si possono preparare utilizzando convenzionali procedure di dissolvimento e miscelazione. Per esempio, la sostanza farmacologica in massa, quindi il composto della presente invenzione o la forma stabilizzata del composto (per esempio, un complesso insieme a un derivato della ciclodestrina o altro noto agente di complessamento) è dissolta in un solvente appropriato in presenza di uno o più eccipienti sopra descritti. Il composto della presente invenzione tipicamente viene formulato in forme di dosaggio farmaceutiche tali da fornire un dosaggio facilmente controllabile del farmaco e consentire adesione da parte del paziente al regime prescritto.

La composizione farmaceutica (o formulazione) per una applicazione può essere allestita in diversi modi a seconda del metodo utilizzato per somministrare il farmaco. Generalmente, un articolo di distribuzione include un contenitore con depositata in esso la formulazione farmaceutica in una forma appropriata. Contenitori appropriati sono risaputi agli esperti nel campo e includono materiali come flaconi (di plastica e vetro), bustine, ampolle, bustine di plastica, cilindri metallici e simili. Il contenitore può anche includere un assemblaggio a prova di manomissione per prevenire l'accesso indiscriminato ai contenuti dell'imballaggio. Inoltre, il contenitore ha depositato su di esso una etichetta che descriverà i contenuti del contenitore. L'etichetta può anche includere le appropriate avvertenze.

Formulazioni farmaceutiche dei composti della presente invenzione si possono preparare per mezzo di varie vie e tipi di somministrazione. Per esempio, un composto di formula Ia avente il grado opportuno di purezza può essere opzionalmente mescolato insieme a diluenti, veicoli, eccipienti o stabilizzanti farmaceuticamente accettabili (Remington's Pharmaceutical Sciences (1995) 18<sup>a</sup> edizione, Mack Publ. Co, Easton, PA), sotto forma di formulazione liofilizzata, polvere granulata, oppure di soluzione acquosa. La formulazione può essere condotta miscelando a temperatura ambiente e a pH appropriato, e al grado utile di purezza, insieme a veicoli fisiologicamente accettabili, cioè veicoli che saranno non-tossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegate. Il pH della formulazione

dipende principalmente dal determinato utilizzo e concentrazione di composto, e può variare tra circa 3 e circa 8.

La formulazione farmaceutica sarà preferibilmente sterile. In particolare, formulazioni da utilizzare per una somministrazione *in vivo* dovranno essere sterili. Una simile sterilizzazione si realizza facilmente per filtrazione attraverso membrane di filtrazione sterili.

La formulazione farmaceutica solitamente può essere conservata come composizione solida, formulazione liofilizzata oppure soluzione acquosa.

Le formulazioni farmaceutiche saranno dosate e somministrate secondo una modalità, cioè alle quantità, concentrazioni, protocolli, andamento, veicoli e via di somministrazione, coerente con la buona pratica clinica. Fattori da tener conto in tale contesto includono il particolare disordine da trattare, il particolare mammifero da trattare, la condizione clinica del singolo paziente, la causa del disordine, la sede di introduzione dell'agente, il metodo di somministrazione, il protocollo di somministrazione, ed altri fattori noti agli operatori sanitari. La "quantità terapeuticamente efficace" del composto da somministrare sarà dettata da tali considerazioni, e la quantità minima necessaria per poter prevenire, migliorare o trattare il disordine mediato da fattori di coagulazione. Tale quantità sarà preferibilmente al disotto della quantità che è tossica per l'ospite o che rende l'ospite significativamente più suscettibile a sanguinamento.

Come regola generale, la quantità iniziale farmaceuticamente efficace del composto di formula Ia somministrato per via orale o parenterale per dose sarà nell'ordine di circa 0,01-1000 mg/kg, quindi tra circa 0,1 e 20 mg/kg di peso corporeo al dì, con il tipico intervallo iniziale di composto da utilizzare tra 0,3 e 15 mg/kg/dì. La dose del composto di formula Ia e la dose di abiraterone da somministrare può variare per ognuna tra circa 1 mg e circa 1000 mg per forma di dosaggio unitario, oppure da circa 10 mg fino a circa 100 mg per forma di dosaggio unitario. Le dosi del composto di formula Ia e abiraterone possono essere somministrate a un rapporto compreso tra circa 1:50 e circa 50:1 in peso, oppure a un rapporto tra circa 1:10 e circa 10:1 in peso.

Diluenti, veicoli, eccipienti e stabilizzanti accettabili saranno non-tossici per i riceventi ai dosaggi e alle concentrazioni impiegate, ed includono tamponi quali fosfato citrato ed altri acidi organici; antiossidanti inclusi acido ascorbico e metionina; conservanti (ad esempio cloruro di octadecildimetilbenzilammonio; cloruro di esametonio; cloruro di benzalconio, cloruro di benzetonio; fenolo, alcol butilico o benzilico; alchilparabeni quali metil- o propil-parabene; catecolo, resorcinolo, cicloesano; 3-pentano, e m-cresolo); polipeptidi a basso peso molecolare (minore di circa 10 residui); proteine quali albumina serica, gelatina oppure immunoglobuline; polimeri idrofili come polivinilpirrolidone; ammino acidi come glicina, glutammina, asparagina, istidina, arginina o lisina; monosaccaridi, disaccaridi ed altri carboidrati inclusi glucosio,

mannosio o destrine; agenti chelanti come EDTA; zuccheri come sucrosio, mannitolo, trealosio oppure sorbitolo; controioni formanti sali come per esempio sodio; complessi metallici (per esempio complessi di Zn-proteina); e/o tensioattivi non-ionici quali TWEEN™, PLURONICS™, oppure propilene glicole (PEG). I principi farmaceutici attivi possono anche essere intrappolati in microcapsule preparate per esempio con tecniche di coacervazione oppure mediante polimerizzazione interfaccia, ad esempio rispettivamente in microcapsule di idrossimetilcellulosa o di gelatina e microcapsule di poli-(metilmetacrilato), in sistemi di trasferimento di farmaco colloidali (per esempio, liposomi, microsfele di albumina, microemulsioni, nanoparticelle e nanocapsule) oppure in macroemulsioni. Tali tecniche sono rivelate in Remington's Pharmaceutical Sciences 18<sup>a</sup> edizione, (1995), Mack Publ. Co, Easton, PA.

Si possono preparare preparazioni a rilascio prolungato di composti di formula Ia. Esempi appropriati di preparazione a rilascio prolungato includono matrici semipermeabili di polimeri idrofobici solidi contenenti un composto di formula Ia, le cui matrici si trovano sotto forma di articoli sagomati, ad esempio pellicole oppure microcapsule. Esempi di matrici a rilascio prolungato includono poliesteri, idrogel (per esempio, poli(2-idrossietil-metacrilato), o poli(vinilalcol), polilattidi (US 3773919), copolimeri di acido L-glutammico e gamma-etil-L-glutammato, copolimeri di etilene vinilacetato non-degradabili, di acido lattico-acido glicolico degradabili, come ad esempio LUPRON DEPOT™ (microsfele iniettabili

costituite da copolimero di acido lattico-acido glicolico e leuprolide acetato) e acido poli-D (-)-3-idrossibutirrico.

Le formulazioni farmaceutiche includono quelle appropriate alle vie di somministrazione qui poste in dettaglio. Le formulazioni possono essere opportunamente presentate in forma di dosaggio unitario e possono essere preparate per mezzo di metodi risaputi nell'arte della farmacia. Tecniche e formulazioni generalmente si trovano in Remington's Pharmaceutical Sciences 18<sup>a</sup> edizione, (1995), Mack Publ. Co, Easton, PA. Tali metodi comportano la fase di messa in associazione del principio attivo con il veicolo che costituisce uno o più ingredienti accessori. In generale, le formulazioni si preparano mettendo in associazione in modo stretto e uniforme il principio attivo insieme a veicoli liquidi o veicoli solidi polverizzati o entrambi e poi, se necessario, sagomando il prodotto.

Formulazioni di un composto di formula Ia e/o abiraterone appropriati alla somministrazione orale si possono preparare in unità distinte quali pillole, capsule di gelatina morbida o dura, bustine, pastiglie, tavolette, sospensioni acquose o in olio, polveri o granuli dispersibili, emulsioni, sciroppi o elisir contenenti ognuna una quantità predeterminata di un composto di formula Ia e/o abiraterone. La quantità di composto di formula Ia e la quantità di abiraterone può essere formulata in una pillola, capsula, soluzione o sospensione come formulazione combinata. In alternativa, il composto di formula Ia e l'abiraterone possono essere formulati separatamente in una pillola, capsula, soluzione o sospensione per la

somministrazione in alternanza.

Le formulazioni si possono preparare secondo un qualsiasi metodo noto nel campo per la fabbricazione di composizioni farmaceutiche, e simili composizioni possono contenere uno o più agenti che includono agenti edulcoranti, agenti aromatizzanti, agenti coloranti e agenti conservanti, con lo scopo di produrre una preparazione gradevole al palato. Le tavolette compresse si possono preparare comprimendo in uno strumento appropriato il principio attivo in una forma a flusso libero, come per esempio una polvere oppure granuli, miscelato opzionalmente insieme a un legante, lubrificante, diluente inerte, conservante, agente disperdente oppure tensioattivo di superficie. Le tavolette stampate possono essere prodotte per stampaggio in uno strumento appropriato di una miscela del principio attivo reso in polvere e bagnato con un diluente liquido inerte. Le tavolette possono essere opzionalmente rivestite oppure segnate e sono formulate opzionalmente in modo da produrre un rilascio lento o controllato del principio attivo.

Gli eccipienti per tavolette di una formulazione farmaceutica possono includere: un agente di riempimento (o diluente) per aumentare il volume in massa del farmaco reso in polvere che costituisce la tavoletta; agenti disintegranti per favorire la riduzione della tavoletta in piccoli frammenti, idealmente in singole particelle di farmaco, quando questa viene ingerita e per favorire il rapido dissolvimento e assorbimento di farmaco; un legante per assicurarsi che si possano formare granuli e tavolette con la

resistenza meccanica richiesta e mantenere assieme la tavoletta dopo che questa sia stata compressa, in questo modo evitandone la rottura in polveri dei suoi componenti durante l'imballaggio, il trasporto e la manipolazione routinaria; un agente di scorrimento per migliorare la fluidità della polvere che va a costituire la tavoletta durante la produzione; un agente lubrificante per assicurarsi che la polvere per la formazione di tavolette non aderisca agli strumenti utilizzati per comprimere la tavoletta durante la fabbricazione. Questi migliorano il flusso delle miscele in polvere nelle presse e minimizzano l'attrito e la rottura quando le tavolette finite sono iniettate dalla strumentazione; un agente antiadesione con funzione simile a quella dell'agente di scorrimento, che riduce l'adesione tra la polvere che va a costituire la tavoletta e lo strumento che viene utilizzato per ottenere la forma della tavoletta durante la fabbricazione; un aroma incorporato nelle tavolette per dare loro un sapore più gradito oppure per mascherarne uno sgradevole; e un colorante per favorire l'identificazione e l'adesione da parte del paziente.

Accettabili sono tavolette contenenti il principio attivo in una miscela insieme ad eccipienti non-tossici farmaceuticamente accettabili che siano appropriati alla fabbricazione di tavolette. Tali eccipienti possono essere per esempio diluenti inerti come carbonato di calcio o carbonato di sodio, lattosio, fosfato di calcio o sodio; agenti di granulazione e disintegrazione come amido di maizena, oppure acido alginico; agenti leganti come amido, gelatina

oppure acacia; ed agenti lubrificanti come per esempio stearato di magnesio, acido stearico oppure talco. Le tavolette possono essere non rivestite oppure rivestite per mezzo di tecniche note che includono il microincapsulamento per ritardare la disintegrazione e l'adsorbimento nel tratto gastrointestinale e quindi produrre un'azione prolungata nell'arco di un periodo di tempo più lungo. Per esempio, può essere impiegato un materiale di prolungamento nel tempo come, per esempio, il solo gliceril monostearato o gliceril distearato oppure con una cera.

Per il trattamento dell'occhio o di altri tessuti esterni, come ad esempio bocca e cute, le formulazioni sono applicate preferibilmente in pomata o crema topiche contenenti il o i principi attivi a una quantità, per esempio, tra lo 0,075 e il 20% p/p. Quando formulati in una pomata, i principi attivi possono essere impiegati con una base per pomata paraffinica oppure miscibile in acqua. In alternativa, i principi attivi possono essere formulati in una crema con una base per crema olio/acqua.

Se desiderato, la fase acquosa della base per crema può includere un alcol poliidrico, quindi un alcol avente due o più gruppi ossidrilici come per esempio propilene glicole, butano, 1,3-diolo, mannitolo, sorbitolo, glicerolo, e polietilene glicole (incluso PEG 400) e loro miscele. Le formulazioni topiche possono includere opportunamente un composto che aumenti l'assorbimento o la penetrazione del principio attivo attraverso la cute o altre aree colpite. Esempi di tali attivatori di penetrazione dermica includono

dimetilsulfossido e analoghi correlati.

La fase oleosa delle emulsioni di tale invenzione può essere costituita da noti ingredienti secondo una nota modalità, inclusa una miscela di almeno un emulsificante con un grasso oppure un olio, oppure con entrambi un grasso e un olio. Di preferenza, un emulsificante idrofilo viene incluso insieme a un emulsificante lipofilo che agisca da stabilizzante. Assieme al o agli emulsificanti con o senza il o gli stabilizzanti costituiscono una cera emulsificante, e la cera insieme all'olio e grasso contengono una base appropriata per pomata che forma la fase dispersa in olio di formulazioni in crema. Gli emulsificanti e stabilizzanti per emulsione appropriati per l'impiego nella formulazione includono Tween® 60, Span® 80, alcol cetostearilico, alcol benzilico, alcol miristilico, gliceril monostearato e sodio lauril solfato.

Le sospensioni acquose delle formulazioni farmaceutiche contengono i materiali attivi in una miscela insieme ad eccipienti appropriati alla fabbricazione di sospensioni acquose. Tali eccipienti includono un agente di sospensione, come per esempio carbossimetilcellulosa sodica, crosscaramellosio, povidone, metilcellulosa, idrossipropilmetilcellulosa, alginato di sodio, polivinilpirrolidone, gomma dragante e gomma di acacia, ed agenti disperdenti o idratanti come per esempio una fosfatide presente in natura (per esempio lecitina), un prodotto di condensazione di un ossido di alchilene con un acido grasso (per esempio poliossietilene stearato), un prodotto di condensazione di ossido di etilene con un alcol

alifatico a catena lunga (per esempio, eptadecaetileneossicetanol), un prodotto di condensazione di ossido di etilene con un estere parziale derivato da un acido grasso e una anidride di esitolo (per esempio, monooleato di poliossietilene sorbitano). La sospensione acquosa può inoltre contenere uno o più conservanti come per esempio etil- o n-propil-p-idrossibenzoato, uno o più agenti coloranti, uno o più agenti aromatizzanti e uno o più agenti edulcoranti come per esempio sucrosio oppure saccarina.

Le composizioni farmaceutiche possono trovarsi sotto forma di preparazione iniettabile sterile, come ad esempio una sospensione iniettabile sterile in acqua oppure in olio. Tale sospensione può essere formulata secondo l'arte nota che impieghi agenti disperdenti o idratanti appropriati e agenti di sospensione che sono stati sopra menzionati. La preparazione iniettabile sterile può essere una soluzione o una sospensione in un solvente o diluente non-tossico accettabile per la via parenterale, ad esempio una soluzione in 1,3-butandiolo oppure preparata da una polvere liofilizzata. Tra i veicoli e i solventi accettabili che possono essere impiegati vi sono acqua, soluzione di Ringer e soluzione isotonica di cloruro di sodio. Inoltre, oli fissi sterili possono essere impiegati solitamente come solvente o mezzo di sospensione. A tale scopo, può essere impiegato un qualsiasi olio fisso blando inclusi mono- o di-gliceridi sintetici. Inoltre, possono essere verosimilmente utilizzati acidi grassi come l'acido oleico nella preparazione di prodotti iniettabili.

La quantità di principio attivo che può essere combinata con il materiale da veicolo per produrre una forma a singolo dosaggio varierà a seconda dell'ospite trattato e dalla particolare modalità di somministrazione. Per esempio, una formulazione di rilascio nel tempo indicata per una somministrazione orale nell'uomo può contenere approssimativamente tra 1 e 1000 mg di materiale attivo costituito con una appropriata e opportuna quantità di materiale da veicolo che può variare tra circa il 5 e circa il 95% delle composizioni totali (peso:peso). La composizione farmaceutica si può preparare per fornire quantità facilmente misurabili per la somministrazione. Per esempio, una soluzione acquosa indicata per una infusione endovenosa può contenere tra circa 3 e 500 µg di principio attivo per millilitro di soluzione, con lo scopo che si possa avere l'infusione di un volume appropriato a una velocità pari a circa 30 ml/ora.

Formulazioni appropriate a una somministrazione parenterale includono soluzioni per iniezione non-acquose sterili che possono contenere anti-ossidanti, tamponi, batteriostatici e soluti che rendano la formulazione isotonica con il sangue del ricevente indicato; e sospensioni acquose e non-acquose sterili che possono includere agenti di sospensione e agenti addensanti.

Formulazioni appropriate a una somministrazione topica nell'occhio includono anche gocce oculari dove il principio attivo è dissolto oppure risospeso in un veicolo appropriato, soprattutto un solvente acquoso per il principio attivo. Il principio attivo è preferibilmente presente in simili formulazioni a una concentrazione

compresa tra circa lo 0,5 e il 20% p/p, per esempio tra circa lo 0,5 e il 10% p/p, per esempio circa l'1,5% p/p.

Formulazioni appropriate a una somministrazione topica in bocca includono pastiglie comprendenti il principio attivo in una base aromatizzata, solitamente sucrosio e acacia oppure agente dragante; pastiglie comprendenti il principio attivo in una base inerte come gelatina e glicerina, oppure sucrosio ed acacia; e collutori comprendenti il principio attivo in un appropriato veicolo liquido.

Formulazioni per una somministrazione rettale possono essere presentate in supposta con una base appropriata comprendente per esempio burro di cacao oppure un salicilato.

Formulazioni appropriate per una somministrazione intrapolmonare o nasale hanno una misura particellare per esempio nell'intervallo tra 0,1 e 500 micron (incluse misure particellari in un intervallo tra 0,1 e 500 micron in incrementi di micron come per esempio 0,5, 1, 30 micron, 35 micron, ecc.), che sono somministrate con una rapida inalazione attraverso le vie nasali oppure un'inalazione attraverso la bocca in modo da raggiungere le sacche alveolari. Appropriate formulazioni includono soluzioni acquose o in olio del principio attivo. Formulazioni appropriate per la somministrazione in aerosol o in polvere anidra si possono preparare secondo metodi convenzionali e possono essere trasferite con altri agenti terapeutici come ad esempio i composti fino ad ora utilizzati nel trattamento o nella profilassi di disordini come sotto descritti.

Formulazioni appropriate a una somministrazione vaginale possono

essere presentate come pessari, tamponi, creme, gel, paste, schiume oppure formulazioni spray contenenti oltre al principio attivo veicoli noti nel campo per essere appropriati.

Le formulazioni possono essere confezionate in contenitori a dose unitaria oppure multi-dose, per esempio ampolle e fiale sigillate, e possono essere conservate in condizione crio-essiccata (liofilizzata) che richieda solamente l'aggiunta del veicolo liquido sterile, per esempio acqua per iniezione, immediatamente prima dell'uso. Sospensioni e soluzioni per iniezione estemporanee si preparano a partire da polveri sterili, granuli e compresse del genere precedentemente descritto. Le formulazioni a dosaggio unitario preferite sono quelle contenenti una dose giornaliera oppure una sub-dose giornaliera unitaria, come qui esposto, altrimenti una appropriata sua frazione, di principio attivo.

#### TERAPIA COMBINATA

Il composto di formula Ia è impiegato nell'invenzione in combinazione ad abiraterone per il trattamento del cancro alla prostata. In alcune forme di realizzazione, un composto di formula I è combinato in un regime di dosaggio come terapia combinata, insieme ad abiraterone. Tali composti possono essere somministrati in quantità che saranno efficaci per lo scopo indicato. In una forma di realizzazione, la combinazione terapeutica è somministrata con un regime di dosaggio nel quale la quantità terapeuticamente efficace di un composto di formula Ia è somministrata in un intervallo variabile tra due volte al giorno e una volta ogni tre settimane (q3wk) e la

quantità terapeuticamente efficace di abiraterone è somministrata in un intervallo tra due volte al giorno e una volta ogni tre settimane.

La terapia combinata può essere somministrata come regime simultaneo o sequenziale. Quando somministrata in sequenza, la combinazione può essere somministrata in due o più somministrazioni. La somministrazione combinata include la co-somministrazione, utilizzando una formulazione separata, e la somministrazione consecutiva in un qualsiasi ordine, dove preferibilmente vi sarà un periodo di tempo in cui entrambi (o tutti) gli agenti attivi esercitano contemporaneamente le loro attività biologiche.

In uno specifico aspetto dell'invenzione, il composto di formula Ia può essere somministrato per un periodo di tempo variabile tra circa 1 e circa 10 giorni dopo che inizi la somministrazione di abiraterone. In un altro specifico aspetto dell'invenzione, il composto di formula Ia può essere somministrato per un periodo di tempo variabile tra circa 1 e 10 giorni prima che inizi la somministrazione della combinazione. In un altro specifico aspetto dell'invenzione, la somministrazione del composto di formula Ia e somministrazione di abiraterone inizia allo stesso giorno.

Appropriati dosaggi per uno dei suddetti agenti co-somministrati sono quelli attualmente utilizzati e possono essere abbassati grazie all'azione combinata (sinergia) dell'agente appena identificato e di altri agenti o trattamenti chemioterapici, come per esempio per aumentare l'indice terapeutico oppure mitigare la tossicità o altri effetti collaterali o conseguenze.

In una determinata forma di realizzazione di una terapia anti-cancro, un composto di formula Ia può essere combinato insieme ad abiraterone, così come combinato insieme alla terapia chirurgica e alla radioterapia. Le quantità del composto di formula Ia e l'altro o gli altri agenti chemioterapici farmacologicamente attivi e i relativi tempi di somministrazione saranno selezionati con lo scopo di raggiungere il desiderato effetto terapeutico combinato.

#### SOMMINISTRAZIONE DI COMPOSIZIONI FARMACEUTICHE

I composti possono essere somministrati attraverso una qualsiasi via appropriata alla condizione da trattare. Le vie appropriate includono quella orale, parenterale (incluse la sottocutanea, intramuscolare, endovenosa, intraarteriosa, per inalazione, intradermica, intratecale, epidurale e tecniche di infusione), transdermica, rettale, nasale, topica (inclusa la boccale e sublinguale), vaginale, intraperitoneale, intrapolmonare e intranasale. La somministrazione topica può anche comportare l'impiego di una somministrazione transdermica come per esempio cerotti transdermici oppure dispositivi di iontoforesi.

Una formulazione dei farmaci viene riportata in Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>a</sup> Ed., (1995), Mack Publishing Co., Easton, PA. Altri esempi di formulazioni di farmaci si possono trovare in Liberman, H.A. E Lachman, L., Eds., Pharmaceutical Dosage Forms, Marcel Decker, Vol. 3, 2<sup>a</sup> Ed., New York, NY. Per un trattamento immunosoppressivo locale, i composti possono essere somministrati attraverso una somministrazione intralesionale, che

include la perfusione o altrimenti il contatto dell'innesto con l'inibitore prima del trapianto. Si terrà conto che la via preferita può variare per esempio con la condizione del ricevente. Quando il composto è somministrato oralmente, questo può essere formulato sotto forma di pillola, capsula, tavoletta, ecc., insieme a un veicolo, agente di scorrimento o eccipiente farmaceuticamente accettabile. Laddove il composto sia somministrato per via parenterale, questo può essere formulato con un veicolo o diluente parenterale farmaceuticamente accettabile, e in una forma iniettabile a dosaggio unitario, come sotto posto in dettaglio.

Una dose per trattare pazienti umani può variare tra circa 20 mg fino a circa 1600 mg al dì del composto di formula Ia o di un suo sale farmaceuticamente accettabile. Una tipica dose può essere tra circa 50 mg e circa 800 mg del composto. Una dose può essere somministrata una volta al dì (QD), due volte al dì (BID), oppure più spesso, a seconda delle proprietà farmacocinetiche (PK) e farmacodinamiche (PD), che includono l'assorbimento, la distribuzione, il metabolismo e l'escrezione del particolare composto. Inoltre, fattori di tossicità possono influenzare il dosaggio e il regime di dosaggio per una somministrazione. Quando somministrata oralmente, la pillola, capsula o tavoletta può essere ingerita due volte al dì, giornalmente oppure meno spesso come per esempio settimanalmente oppure una volta ogni due o tre settimane per un periodo di tempo specificato. Il regime può essere ripetuto per diversi cicli di terapia.

## METODI DI TRATTAMENTO

Combinazioni terapeutiche di: (1) un composto di formula Ia e (2) abiraterone sono utili per il trattamento del cancro alla prostata (incluso cancro prostatico resistente alla castrazione "CRPC").

## ARTICOLI DI FABBRICAZIONE

Viene anche descritto un articolo di fabbricazione, o "corredo", contenente un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile per l'impiego come definito nella rivendicazione 1. In un caso, il corredo comprende un contenitore e un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

Il corredo può inoltre comprendere una etichetta o foglietto illustrativo, su di esso oppure associato al contenitore. Il termine "foglietto illustrativo" è utilizzato per fare riferimento alle istruzioni solitamente incluse in imballaggi commerciali di prodotti terapeutici, che contengono le informazioni riguardanti le indicazioni, l'utilizzo, il dosaggio, la somministrazione, le controindicazione e/o avvertenze legate all'impiego di tali prodotti terapeutici. Appropriati contenitori includono, per esempio, flaconi, fiale, siringhe, confezione blister, ecc. Il contenitore può essere formato da diversi materiali come vetro e plastica. Il contenitore può contenere un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile o una sua formulazione che sia efficace per il trattamento della condizione, e può avere un ingresso di accesso sterile (ad esempio, il contenitore può essere una sacca per soluzione endovenosa oppure una fiala avente un tappo forabile per

iniezione ipodermica). Almeno un agente attivo nella composizione sarà un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile. L'etichetta o il foglietto illustrativo indica che la composizione è utilizzata per trattare la condizione d'elezione. In alternativa, o in aggiunta, l'articolo di fabbricazione può anche comprendere un secondo contenitore comprendente un tampone farmaceuticamente accettabile, come per esempio acqua batteriostatica per iniezione (bacteriostatic water for injection (BWFI), soluzione salina in tampone fosfato, soluzione di Ringer e soluzione in destrosio. Può inoltre contenere altri materiali opportuni dal punto di vista commerciale e per l'utente, inclusi altri tamponi, diluenti, filtri, aghi e siringhe.

Il corredo può inoltre comprendere le direzioni per la somministrazione di un composto di formula Ia o di un suo sale farmaceuticamente accettabile ed abiraterone. Per esempio, se il corredo comprende una prima composizione comprendente un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile ed abiraterone, il corredo può anche comprendere le direzioni per una somministrazione simultanea, sequenziale o separata del composto di formula Ia ed abiraterone in un paziente che ne abbia la necessità.

In un altro caso, i corredi sono appropriati per il trasferimento di forme solide orali di un composto di formula Ia o di un suo sale farmaceuticamente accettabile, come per esempio tavolette oppure capsule. Un simile corredo include preferibilmente diversi dosaggi unitari. Tali corredi possono includere una carta avente i

dosaggi orientati secondo l'ordine del loro utilizzo indicato. Un esempio di un simile corredo è una "confezione blister". Confezioni blister sono risapute nell'industria dell'imballaggio e sono ampiamente utilizzate per confezionare forme farmaceutiche a dosaggio unitario. Se opportuno, può essere dato un promemoria, per esempio sotto forma di numeri, lettere o altri segni, oppure con un foglietto calendario che indichi i giorni nel protocollo di trattamento in cui possono essere somministrati i dosaggi.

Un corredo può comprendere (a) un primo contenitore con un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile in esso contenuto, e opzionalmente (b) un secondo contenitore con abiraterone in esso contenuto. In alternativa, o in aggiunta, il corredo può anche comprendere un terzo contenitore comprendente un tampone farmaceuticamente accettabile, come ad esempio acqua bacteriostatica per iniezione (BWFI), soluzione salina in tampone fosfato, soluzione di Ringer e soluzione in destrosio. Può inoltre includere altri materiali opportuni dal punto di vista commerciale per l'utente, inclusi altri tamponi, diluenti, filtri, aghi e siringhe.

Laddove il corredo comprenda una composizione di un composto di formula Ia o un suo sale farmaceuticamente accettabile e abiraterone, cioè l'agente chemioterapico, il corredo può comprendere un contenitore per contenere le composizioni separate, come per esempio un flacone diviso oppure una bustina divisa, in ogni caso, le composizioni separate possono anche essere contenute all'interno di

un unico contenitore non diviso. Tipicamente, il corredo comprende le direzioni per la somministrazione dei componenti separati. La forma in corredo è particolarmente utile quando i componenti separati sono somministrati preferibilmente in forme di dosaggio differenti (per esempio orale e parenterale), sono somministrate in intervalli di dosaggio differenti, oppure quando la titolazione dei singoli componenti della combinazione è indicata dal medico curante.

#### ASPETTI SPECIFICI DELL'INVENZIONE

In uno specifico aspetto, il composto di formula Ia è per la somministrazione per via simultanea con abiraterone.

In uno specifico aspetto, il composto di formula Ia è per la somministrazione in sequenza con abiraterone.

In uno specifico aspetto, il composto di formula Ia e abiraterone sono per una somministrazione in modo separato.

In uno specifico aspetto, il cancro alla prostata è associato a mutazione di PTEN.

In uno specifico aspetto, il cancro alla prostata è associato a una mutazione, sovraespressione oppure amplificazione di AKT.

In uno specifico aspetto, il cancro alla prostata è associato a mutazione di PI3K.

In uno specifico aspetto, il cancro alla prostata è associato a una mutazione di Her2/ErbB2.

In uno specifico aspetto, la combinazione produce un effetto sinergico nel trattamento del cancro alla prostata, dove opzionalmente il valore dell'indice di combinazione dell'effetto

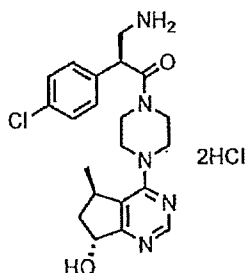
sinergico è minore di circa 0,8.

Uno specifico aspetto dell'invenzione riguarda un composto di formula Ia per l'impiego terapeutico volto a migliorare la qualità di vita di un paziente trattato per il cancro alla prostata con abiraterone.

In uno specifico aspetto, il cancro alla prostata è cancro prostatico castrazione-resistente.

#### ESEMPI

Con lo scopo di illustrare l'invenzione, sono inclusi i seguenti esempi. In ogni caso, si deve comprendere che tali esempi non limitano l'invenzione e vanno solamente compresi per suggerire un metodo per la messa a punto dell'invenzione. Le persone esperte nel campo sapranno che le reazioni chimiche descritte possono essere facilmente adattate per preparare diversi altri inibitori di AKT dell'invenzione, e che metodi alternativi per preparare i composti di tale invenzione sono ritenuti far parte dell'ambito di tale invenzione. Per esempio, la sintesi di composti non-rappresentati secondo l'invenzione può essere eseguita con successo per mezzo di modificazioni chiare agli esperti nel campo, per esempio proteggendo adeguatamente i gruppi interferenti, utilizzando altri reagenti idonei noti nel campo diversi da quelli descritti, e/o eseguendo modificazioni routinarie di condizioni di reazione. In alternativa, altre reazioni qui rivelate oppure note nel campo saranno riconosciute per avere un'applicabilità nella preparazione di altri composti dell'invenzione.

**Esempio 1** (Esempio comparativo)

Preparazione di (S)-3-ammino-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)propan-1-one dicloridrato

Fase 1: In un pallone da 1 l sono stati aggiunti (R)-(+)-pulegone (76,12 g, 0,5 mmoli), NaHCO<sub>3</sub> anidro (12,5 g) e etere anidro (500 ml). La miscela di reazione è stata raffreddata con una vasca di ghiaccio sotto azoto. E' stato aggiunto bromo (25,62 ml, 0,5 mmoli) goccia a goccia nell'arco di 30 minuti. La miscela è stata filtrata e aggiunta con cura a NaOEt (21%, 412 ml, 1,11 mmoli) in una vaschetta raffreddata con ghiaccio. La miscela è stata agitata alla temperatura ambiente per una notte, dopo di che è stato aggiunto 1 l di HCl al 5% e 300 ml di etere. La fase acquosa è stata estratta con etere (2 x 300 ml). La fase organica combinata è stata lavata con acqua, essiccata e concentrata. Il residuo è stato aggiunto in una soluzione riscaldata di semicarbazide cloridrato (37,5 g) e NaOAc (37,5 g) in acqua (300 ml), e poi è stato aggiunto etanolo bollente (300 ml) fino a dare una soluzione trasparente. La miscela è stata riscaldata a riflusso per 2,5 ore, quindi agitata per una notte alla temperatura ambiente. La miscela è stata trattata con 1 l di acqua e 300 ml di

etere. La fase acquosa è stata estratta con etere (2 x 300 ml). La fase organica combinata è stata lavata con acqua, essiccata e concentrata. Il residuo è stato purificato per distillazione sottovuoto (73-76°C a 0,8 mm Hg) per dare (2R)-etil 2-metil-5-(propan-2-ilidene)ciclopentanocarbossilato (63 g, 64%).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  4.13 (m, 2H), 3.38 (d,  $J = 16$  Hz, 0.5H), 2.93 (m, 0.5H), 2.50-2.17 (m, 2H), 1.98 (m, 1H), 1.76 (m, 1H), 1.23 (m, 6H), 1.05 (m, 6H).

Fase 2: (2R)-etil 2-metil-5-(propan-2-ilidene)ciclopentanocarbossilato (24 g, 0,122 moli) in etil acetato (100 ml) è stato raffreddato fino a -68°C con ghiaccio secco/isopropanolo. Ossigeno ozonizzato (5-7  $\text{ft}^3\text{h}^{-1}$  di  $\text{O}_2$ ) è stato fatto gorgogliare attraverso la soluzione per 3,5 ore. La miscela di reazione è stata spurgata con azoto alla temperatura ambiente fino a che non scomparisse il colore. L'etil acetato è stato rimosso sottovuoto e il residuo dissolto in 150 ml di acido acetico e raffreddato con acqua ghiacciata, ed è stata aggiunta polvere di zinco (45 g). La soluzione è stata agitata per 30 minuti, quindi filtrata. Il filtrato è stato neutralizzato con NaOH 2N (1,3 l) e  $\text{NaHCO}_3$ . La fase acquosa è stata estratta con etere (3 x 200 ml). La fase organica è stata combinata, lavata con acqua, essiccata e concentrata fino ad ottenere (2R)-etil 2-metil-5-ossociclopentanocarbossilato (20 g, 96%).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  4.21 (m, 2H), 2.77 (d,  $J = 11.2$  Hz, 1H), 2.60 (m, 1H), 2.50-2.10 (m, 3H), 1.42 (m, 1H), 1.33 (m, 3H), 1.23 (m, 3H).

Fase 3: In una soluzione di una miscela di (2R)-etil 2-metil-5-ossociclopentanocarbossilato (20 g, 117,5 mmoli) e tiourea (9,2 g, 120,9 mmoli) in etanolo (100 ml) era aggiunto KOH (8,3 g, 147,9 mmoli) in acqua (60 ml). La miscela è stata riscaldata a riflusso per

10 ore. Dopo aver raffreddato, il solvente è stato rimosso e il residuo neutralizzato con HCl concentrato (12 l) a 0°C, quindi estratto con DCM (3 x 150 ml). Il solvente è stato rimosso, e il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice eluendo con esano/etil acetato (2:1) per dare (R)-2-mercapto-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-olo (12 g, 56%). MS (APCI+) [M+H] + 183.

Fase 4: In una sospensione di (R)-2-mercapto-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-olo (12 g, 65,8 mmoli) in acqua distillata (100 ml) è stato aggiunto nichel di Raney (15 g) e NH<sub>4</sub>OH (20 ml). La miscela è stata riscaldata a riflusso per 3 ore, quindi filtrata, e il filtrato è stato completato fino ad ottenere (R)-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-olo (9,89 g, 99%). MS (APCI+) [M+H] + 151.

Fase 5: Una miscela di (R)-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-olo (5,8 g, 38,62 mmoli) in POCl<sub>3</sub> (20 ml) è stata riscaldata a riflusso per 5 minuti. POCl<sub>3</sub> in eccesso è stato rimosso sottovuoto e il residuo è stato dissolto in DCM (50 ml). La miscela è stata poi aggiunta in NaHCO<sub>3</sub> saturo (200 ml). La fase acquosa è stata estratta con DCM (3 x 100 ml), e le fasi organiche combinate sono state essiccate e concentrate. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con etil acetato fino a dare (R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidina (3,18 g, 49%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.81 (s, 1H), 3.47 (m, 1H), 3.20 (m, 1H), 3.05 (m, 1H), 2.41 (m, 1H), 1.86 (m, 3H), 1.47 (m, 3H).

Fase 6: In una soluzione di (R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidina (2,5 g, 14,8 mmoli) in  $\text{CHCl}_3$  (60 ml) è stato aggiunto MCPBA (8,30 g, 37,0 mmoli) in tre parti. La miscela è stata agitata alla temperatura ambiente per 2 giorni. La miscela è stata raffreddata fino a  $0^\circ\text{C}$  e a questa è stato aggiunto goccia a goccia  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (10 g) in acqua (60 ml), seguito da  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (6 g) in acqua (20 ml). La miscela di reazione è stata agitata per 20 minuti. La fase acquosa è stata estratta con  $\text{CHCl}_3$  (2 x 200 ml), e le fasi organiche combinate sono state concentrate a bassa temperatura ( $<25^\circ\text{C}$ ). Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con etil acetato-DCM/MeOH (20:1) per dare (R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-ossido (1,45 g, 53%).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.66 (s, 1H), 3.50 (m, 1H), 3.20 (m, 2H), 2.44 (m, 1H), 1.90 (m, 1H), 1.37 (d,  $J = 7.2$  Hz, 3H).

Fase 7: Una soluzione di (R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-ossido (1,45 g, 7,85 mmoli) in anidride acetica (20 ml) è stata riscaldata fino a  $150^\circ\text{C}$  per 2 ore. Dopo aver raffreddato, il solvente in eccesso è stato rimosso sottovuoto. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con esano/etil acetato (3:1) per dare (5R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-il acetato (1,25 g, 70%).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\delta$  8.92 (m, 1H), 6.30-6.03 (m, 1H), 3.60-3.30 (m, 1H), 2.84 (m, 1H), 2.40-2.20 (m, 1H), 2.15 (d,  $J = 6$  Hz, 2H), 1.75 (m, 2H), 1.47 (d,  $J = 6.8$ , 2H), 1.38 (d,  $J = 7.2$ , 1H). MS (APCI+)  $[M+H]^+$  +227.

Fase 8: in una soluzione di (5R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-il acetato (0,5 g, 2,2 mmoli) in NMP (10 ml) è stata aggiunta 1-Boc-piperazina (0,9 g, 4,8 mmoli). La miscela di

reazione è stata riscaldata fino a 110°C per 12 ore. Dopo aver raffreddato, la miscela di reazione è stata diluita con etil acetato (200 ml) e lavata con acqua (6 x 100 ml). La fase organica è stata essiccata e concentrata. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con etil acetato fino a dare 4-((5R)-7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (0,6 g, 72%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.60 (d, 1H), 6.05-5.90 (m, 1H), 3.80-3.30 (m, 9H), 2.84 (m, 1H), 2.20 (m, 1H), 1.49 (s, 9H), 1.29-1.20 (m, 3H). MS (APCI+) [M+H]<sup>+</sup> 377.

La miscela risultante dei diastereomeri è stata purificata mediante HPLC preparativa chirale (colonna Chiralcel ODH, 250 x20 mm, esano/EtOH 60:40, 21 ml/min). Il primo picco (RT = 3,73 min) ha dato il *terz*-butil 4-((5R,7R)-7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (0,144 g, 24%). Il secondo picco (RT = 5,66 min) ha dato il *terz*-butil 4-((5R,7S)-7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (0,172 g, 29%). MS (APCI+) [M+H]<sup>+</sup> 377.

Fase 9: In una soluzione di 4-((5R,7R)-7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (0,144 g, 0,383 mmoli) in THF (4 ml) è stato aggiunto LiOH (3 M, 2 ml). La miscela è stata agitata alla temperatura ambiente per 6 ore e poi bloccata con HCl 2 N (3 ml). Il solvente è rimosso e il residuo purificato mediante cromatografia su gel di silice, eluendo con etil acetato fino a dare *terz*-butil 4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (89 mg, 70%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 8.52 (s, 1H), 5.48 (br, 1H), 5.14 (m, 1H), 3.82-3.40 (m, 9H), 2.20 (m, 2H), 1.49 (s, 9H), 1.19 (d, J = 6.8 Hz, 3H). MS (APCI+)- [M+H]<sup>+</sup> +335.

Fase 10: 4-((5R,7R)-7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato è stato trattato con HCl (4 M in diossano, 2 ml) in DCM (5 ml) per 6 ore per dare (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidin-7-olo di-cloridrato. MS (APCI+) [M+H]<sup>+</sup> + 235.

Fase 11: terz-butil 2,4-dimetossibenzilcarbammato (3,96 g, 14,8 mmoli) è stato dissolto in THF (74 ml) e raffreddato fino a -78°C. La soluzione è stata trattata con litio butilico (7,44 ml, 16,3 mmoli) nell'arco di un periodo di 5 minuti fino ad ottenere una soluzione di colore giallo pallido. La soluzione è stata lasciata agitare per 15 minuti prima che venisse aggiunto goccia a goccia (tale e quale) cloro(metossi)metano (1,35 ml, 17,8 mmoli). La reazione è stata agitata a -78°C per 10 minuti, quindi lasciata riscaldare lentamente alla temperatura ambiente per una notte. La reazione è stata concentrata sottovuoto fino ad ottenere un gel di colore giallo che è stato spartito tra una soluzione semi-satura di NH<sub>4</sub>Cl ed etere. Lo strato acquoso è stato estratto una volta, e gli estratti organici sono stati combinati. Lo strato organico è stato lavato con acqua, poi con soluzione salina, separato, essiccato sopra Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato sottovuoto. La <sup>1</sup>H-NMR supporta l'opportuno e quasi puro (>90%) terz-butil 2,4-dimetossibenzil(metossimetil)carbammato (4,81 g, 104% di resa) sotto forma di un olio di colore giallo pallido che è stato utilizzato per la purificazione.

Fase 12: (R)-4-benzil-3-(2-(4-clorofenil)acetil)diazolidin-2-one (3,00 g, 9,10 mmoli) è stato dissolto in DCM (91 ml) e raffreddato fino a  $-78^{\circ}\text{C}$ . Alla soluzione è stata aggiunta una soluzione in toluene 1 M di  $\text{TiCl}_4$  (11,4 ml, 11,4 mmoli) seguita da DIEA (1,66 ml, 9,55 mmoli) fino ad ottenere una reazione color porpora scuro. Questa è stata lasciata agitare per 15 minuti prima che venisse aggiunto il *tert*-butil 2,4-dimetossibenzil(metossimetil)carbammato (3,40 g, 10,9 mmoli) con soluzione in DCM (10 ml) goccia a goccia. La reazione è stata lasciata agitare per 15 minuti a  $-78^{\circ}\text{C}$ , quindi lasciata riportare a  $-18^{\circ}\text{C}$  in una vaschetta con soluzione salina e ghiaccio per un'ora. Questa reazione è stata lasciata riportare lentamente a  $0^{\circ}\text{C}$  nell'arco di un periodo di 2,5 ore. La reazione è stata poi bloccata con l'addizione di una soluzione satura di  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (100 ml). Gli strati sono stati separati, e gli strati organici estratti una volta con DCM. Gli strati organici combinati sono stati essiccati sopra  $\text{MgSO}_4$ , filtrati e concentrati sottovuoto fino ad ottenere un olio di colore giallo. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia (gel di silice eluito con esani:etil acetato 4:1) fino ad ottenere il materiale puro sotto forma di un olio incolore di *tert*-butil 2,4-dimetossibenzil((S)-3-((R)-4-benzil-2-ossosazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-ossopropil)carbammato (4,07 g, 73,5% di resa). Questo *tert*-butil 2,4-dimetossibenzil((S)-3-((R)-4-benzil-2-ossosazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-ossopropil)carbammato (680 mg, 1,12 mmoli) è stato dissolto in DCM (10,6 ml) e acqua (560  $\mu\text{l}$ ; DCM:acqua 19:1) alla temperatura ambiente. La soluzione è stata

trattata con DDQ (380 mg, 1,67 mmoli), e la reazione è stata lasciata agitare per un giorno fino ad ottenere il completamento della reazione secondo analisi TLC e LCMS. La reazione è stata diluita con DCM e lavata due volte con soluzione semisatura di NaHCO<sub>3</sub>. Lo strato organico è stato essiccato sopra MgSO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato sottovuoto fino ad ottenere un olio di colore giallo-arancio. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia (gel di silice eluito con esani:etil acetato 9:1) fino ad ottenere una miscela del sottoprodotto aldeidico e di *terz*-butil (S)-3-((R)-4-benzil-2-ossosazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-ossopropil)carbammato (non separabile) sotto forma di un olio di colore giallo pallido (729 mg di massa combinata). LC/MS (APCI+) m/z 359,1 [M-BOC+H]<sup>+</sup>.

Fase 13: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 35% (0,240 ml, 2,91 mmoli) è stato aggiunto in una soluzione di LiOH-H<sub>2</sub>O (0,0978 g, 2,33 mmoli) in THF:H<sub>2</sub>O 2:1 (33 ml). La miscela di reazione è stata agitata alla temperatura ambiente per 35 minuti, dopo di che raffreddata fino a 0°C. Una soluzione contenente una miscela di *terz*-butil (S)-3-((R)-4-benzil-2-ossosazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-ossopropil)carbammato (0,535 g, 1,17 mmoli) e 2,4-dimetossibenzaldeide (0,194 g, 1,17 mmoli) in THF (7 ml) è stata aggiunta goccia a goccia con un imbuto di addizione. La vasca con ghiaccio è stata lasciata riscaldare lentamente, e la miscela di reazione agitata per una notte. La miscela di reazione è stata poi raffreddata fino a 0°C ed è stato aggiunto Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> 1 M (7 ml). La miscela è stata agitata per 5 minuti, quindi riportata alla temperatura ambiente ed agitata per altri 20 minuti. La miscela di

reazione è stata poi trasferita in un imbuto separatore e lavata con etere (3 X). Lo strato acquoso è stato acidificato con  $\text{KHSO}_4(\text{s})$ , e la miscela è stata estratta con DCM (2 X). Gli estratti combinati sono stati essiccati ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrati e concentrati fino a dare l'acido (S)-3-(terz-butossicarbonilammino)-2-(4-clorofenil)propanoico (0,329 g, 94,2% di resa) sotto forma di un residuo bianco. LC/MS (APCI+) m/z 200 [M-BOC+H]+.

Fase 14: 4M HCl/diossano (5,49 ml, 22,0 mmoli) è stato aggiunto in una soluzione di acido (S)-3-(terz-butossicarbonilammino)-2-(4-clorofenil)propanoico (0,329 g, 1,10 mmoli) in diossano:DCM 2:1 (10 ml). La miscela di reazione è stata agitata alla temperatura ambiente per una notte (16 ore) dopo di che è stata concentrata a 1/3 di volume. La miscela torbida risultante è stata diluita con etere, e la miscela è stata concentrata di nuovo a 1/3 di volume. La miscela è stata di nuovo diluita con etere (20 ml), e il residuo secco isolato per filtrazione attraverso un imbuto vetroso medio con pressione di azoto, risciacquato con etere (5 x 10 ml), essiccato a pressione di azoto, ed essiccato sottovuoto fino a dare l'acido (S)-3-ammino-2-(4-clorofenil)propanoico cloridrato (0,199 g, 76,8% di resa) sotto forma di una polvere di colore bianco. HPLC puro > 99% di area. LC/MS (APCI+) m/z 200.

Fase 15: Boc2O (0,368 g, 1,69 mmoli) è stato aggiunto in una soluzione di acido (S)-3-ammino-2-(4-clorofenil)propanoico cloridrato (0,199 g, 0,843 mmoli) e idrossido di tetrametilammonio pentaidrato (0,382 g, 2,11 mmoli) in MeCN:H<sub>2</sub>O 10:1 (7,7 ml). La miscela di

reazione è stata agitata per una notte alla temperatura ambiente (12 ore) dopo di che MeCN è stato rimosso su évaporatore rotativo. La miscela è stata diluita con acqua e lavata con etere (2 X). Lo strato acquoso è stato acidificato con  $\text{KHSO}_4(\text{s})$ , la miscela è stata estratta con DCM, e gli estratti combinati essiccati ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrati e concentrati fino a dare l'acido (S)-3-(terz-butossicarbonilammino)-2-(4-clorofenil)propanoico (0,229 g, 90,6% di resa) in forma schiumosa. LC/MS (APCI+) m/z 200 [M-BOC+H]+.

Fase 16: In una soluzione di (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-olo dicloridrato (88 mg, 0,29 mmoli) e acido (S)-3-(terz-butossicarbonilammino)-2-(4-clorofenil)propanoico (86 mg, 0,29 mmoli) in DCM (10 ml) e diisopropilettilammina (0,22 ml, 1,3 mmoli) è stato aggiunto HBTU (110 mg, 0,29 mmoli). La miscela di reazione è stata agitata alla temperatura ambiente per 1 ora. Il solvente è stato rimosso e il residuo dissolto in etil acetato (100 ml), lavato con acqua (6 x 50 ml). La fase organica è stata essiccata e concentrata fino a dare terz-butil (S)-2-(4-clorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-ossopropilcarbammato (116 mg, 78%).

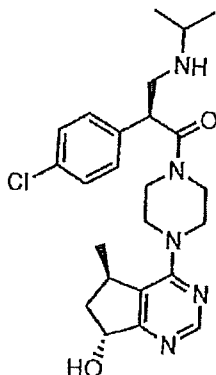
$^1\text{H NMR}$  (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz)  $\delta$  8.51 (s, 1H), 7.34-7.20 (m, 4H), 5.15-5.09 (m, 2H), 4.15-4.05 (m, 1H), 3.87-3.85 (m, 2H), 3.78-3.38 (m, 7H), 3.22-3.19 (m, 1H), 2.20-2.10 (m, 2H), 1.48 (s, 9H), 1.41 (s, 9H), 1.14-1.12 (d, J=7.2Hz, 3H). MS (APCI+) [M+H] +516.

Fase 17: Trattamento di terz-butil (S)-2-(4-clorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-ossopropilcarbammato con HCl (4M in diossano, 2 ml)

in DCM (5 ml) per 6 ore fino a dare (S)-3-ammino-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)propan-1-one dicloridrato.

<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ 8.38 (s, 1H), 7.37-7.35 (d, J=8.4Hz, 2H), 7.23-7.21 (d, J=8.4Hz, 2H), 5.29-5.25 (m, 1H), 4.64 (s, 9H), 4.31-4.28 (m, 1H), 4.11 (m, 1H), 3.88-3.79 (m, 2H), 3.70-3.20 (m, 10H), 2.23-2.17 (m, 1H), 2.07-1.99 (m, 1H), 1.22-1.20 (m, 2H), 0.98-0.96 (d, J=6.8 Hz, 2H). MS (APCI+) [M+H]<sup>+</sup>+416.

### Esempio 2



(S)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilammino)-propan-1-one

Fase 1: Etil pulegenato (130 g, 662 mmoli) in EtOAc (900 ml) è stato raffreddato fino a -78°C utilizzando una vasca con ghiaccio secco-isopropanolo. Questa miscela è stata sottoposta a ozonolisi fino a che la reazione non passasse al color porpora. A questo punto, la generazione di ozono cessava, e la reazione è stata tolta dalla vaschetta con ghiaccio secco. Dell'ossigeno è stato fatto gorgogliare attraverso la miscela di reazione fino a che non diventasse gialla. La miscela di reazione è stata concentrata sottovuoto, e il residuo risultante dissolto in acido acetico glaciale (400 ml). La soluzione è stata raffreddata fino a 0°C, ed è stata aggiunta polvere di Zn (65

g, 993 mmoli) in più parti nell'arco di 30 minuti. La reazione è stata poi lasciata agitare per 2 ore, al cui punto la miscela di reazione è stata filtrata attraverso un tampone di Celite per rimuovere la polvere di zinco. L'acido acetico è stato neutralizzato a pH 7 con NaOH e NaHCO<sub>3</sub> ed estratto con etere (3 X 800 ml). Gli strati organici combinati sono stati essiccati con soluzione salina, MgSO<sub>4</sub> e concentrati fino a dare (2R)-etil 2-metil-5-ossociclopentano-carbossilato sotto forma di un liquido scuro (107 g, 95%).

Fase 2: È stato aggiunto acetato d'ammonio (240,03 g, 3113,9 mmoli) in una soluzione di (2R)-etil 2-metil-5-ossociclopentano-carbossilato (106,0 g, 622,78 mmoli) in MeOH (1,2 l). La miscela di reazione è stata agitata alla temperatura ambiente sotto azoto per 20 ore, dopo di che questa era completa come giudicato mediante TLC ed HPLC. La miscela di reazione è stata concentrata per rimuovere MeOH. Il residuo risultante è stato dissolto in DCM, lavato due volte con H<sub>2</sub>O, una volta con soluzione salina, essiccato (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrato e concentrato fino a dare (2R)-etil 2-metil-5-metilciclopent-1-ene-carbossilato (102 g, 97% di resa) sotto forma di un olio di colore arancione. LC/MS (APCI+) m/z 170 [M+H]<sup>+</sup>.

Fase 3: Una soluzione contenente (2R)-etil 2-metil-5-metilciclopent-1-ene-carbossilato (161,61 g, 955,024 mmoli) e formiato di ammonio (90,3298 g, 1432,54 mmoli) in formammide (303,456 ml, 7640,19 mmoli) è stata riscaldata a una temperatura interna di 150°C ed agitata per 17 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata e trasferita in un matraccio a un unico collo da 2 l. Dopo di che,

l'eccesso di formamidina è stato rimosso per distillazione a vuoto elevato. Una volta che la formamidina fermasse la comparsa o sviluppo, l'olio restante distillato era dissolto in DCM e lavato con soluzione salina (3 X 200 ml). I lavaggi combinati sono stati estratti con DCM. Gli estratti organici combinati sono stati essiccati ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrati e concentrati. L'olio marrone risultante è stato dissolto in DCM minimo, e questa soluzione è stata aggiunta utilizzando un imbuto separatore in una soluzione in agitazione di etere (circa 5 volumi di etere contro una soluzione di DCM), provocando la precipitazione di forme precipitate di color marrone. Questo precipitato marrone è stato rimosso per filtrazione attraverso un imbuto vetroso medio che è stato risciacquato con etere ed inclinato. Il filtrato è stato concentrato, la triturazione dall'etere ripetuta per altre due volte e poi asciugato su una linea a vuoto elevato fino a dare (R)-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidin-4-olo (93,225 g, 65,00% di resa) sotto forma di un solido pastoso di color giallo-marroncino. LC/MS (APCI-) m/z 149,2.

Fase 4:  $\text{POCl}_3$  puro (463,9 ml, 5067 mmoli) è stato aggiunto lentamente con un imbuto di addizione in una soluzione a  $0^\circ\text{C}$  di (R)-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidin-4-olo (152,2 g, 1013 mmoli) in DCE (1,2 l). Dopo che l'addizione fosse completa, la miscela di reazione è stata riportata alla temperatura ambiente, quindi riscaldata a riflusso e agitata per 70 minuti. La reazione era completa come determinato secondo una HPLC. La miscela di reazione è stata riportata alla temperatura ambiente, e il  $\text{POCl}_3$  in eccesso è

stato bloccato in 4 parti come segue: una miscela di reazione trasferita in imbuto separatore ed immersa in un beaker contenente ghiaccio e soluzione di  $\text{NaHCO}_3$  satura raffreddata in una vaschetta con ghiaccio. Una volta che l'addizione di ogni porzione della miscela di reazione fosse completata, la miscela bloccata è stata agitata per 30 minuti per assicurare una completa distruzione di  $\text{POCl}_3$  prima del trasferimento in imbuto separatore. La miscela è stata trasferita nell'imbuto separatore ed estratta due volte con DCM. Gli estratti combinati sono stati essiccati ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrati e concentrati. Il prodotto grezzo è stato purificato su gel di silice come segue: gel di silice (1 kg) è stato risospeso in esano:etil acetato 9:1 su un imbuto vetrificato da 3 l, lasciato depositare in silice sottovuoto, coperto con sabbia. Il prodotto grezzo è stato caricato con una miscela di DCM/esano e il composto è stato eluito utilizzando matracci con braccio laterale da 1 l sottovuoto. Sottoprodotti ad elevato  $R_f$  eluivano per primi, dopo di che (R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidina (104,4 g, 61,09% di resa) sotto forma di un olio scuro. Trietilammina (93,0 ml, 534 mmoli) e terz butil piperazin-1-carbossilato (34,8 g, 187 mmoli) sono stati aggiunti in una soluzione di (R)-4-cloro-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidina (30,0 g, 187 mmoli) in n-BuOH (250 ml). La miscela di reazione è stata riscaldata a riflusso sotto azoto e agitata per una notte (17 ore), dopo di che concentrata in un rotavap. L'olio risultante è stato dissolto in DCM, lavato con  $\text{H}_2\text{O}$ , essiccato ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), filtrato, ed è stato concentrato. L'olio scuro

risultante è stato purificato su gel di silice eluendo prima con esani:etil acetato 2:1 fino a che il prodotto non eluisse in modo pulito, quindi gradiente tra 1:1 e 1:5 di DCM:etil acetato fino a dare (R)-terz-butil 4-(5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazina-1-carbossilato (42,0 g, 74,1% di resa) sotto forma di una polvere di colore beige. LC/MS (APCI+) m/z 319,1 [M+H]<sup>+</sup>.

Fase 5: MCPBA solido massimo al 77% (23,9 g, 107 mmoli) è stato aggiunto in più parti in una soluzione a 0°C di (R)-terz-butil 4-(5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazina-1-carbossilato (20,0 g, 62,8 mmoli) in CHCl<sub>3</sub> (310 ml). La miscela di reazione è stata agitata per 5 minuti, quindi riportata alla temperatura ambiente e agitata per 90 minuti. La HPLC risultava simile dopo 7,5 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata fino a 0°C, quindi sono stati aggiunti NaHCO<sub>3</sub> (13,2 g, 157 mmoli) e altri 0,5 equivalenti di m-CPBA. La miscela di reazione è stata agitata per una notte (14 ore). La miscela di reazione è stata riportata a 0°C, ed è stata aggiunta una soluzione di Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (29,8 g, 188 mmoli) in H<sub>2</sub>O (50 ml) goccia a goccia con un imbuto di addizione. Questo è stato seguito da una soluzione di Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (24,6, 232 mmoli) in H<sub>2</sub>O (50 ml) e con un imbuto di addizione (la miscela diventa omogenea). La miscela di reazione è stata agitata per 30 minuti, dopo di che la miscela è stata estratta con CHCl<sub>3</sub> (3 x 150 ml). Gli estratti combinati sono stati essiccati (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati fino a dare l'N-ossido. LC/MS (APCI+) m/z 335,1 [M+H]<sup>+</sup>.

Fase 6: Ac<sub>2</sub>O (77,0 ml, 816 mmoli) è stato aggiunto all'N-ossido

(21,0 g, 62,8 mmoli) di Fase 5. La miscela di reazione è stata riscaldata sotto azoto in una vaschetta con sabbia a 90°C ed agitata per 100 minuti. La miscela di reazione è stata riscaldata alla temperatura ambiente, e l'anidride acetica in eccesso è stata rimossa mediante evaporazione rotante. L'olio risultante è stato dissolto in DCM, che è stato poi versato con cura in Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> saturo di ghiaccio. La miscela è stata estratta con DCM, e gli estratti combinati sono stati essiccati (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati fino a dare (5R)-terz-butyl 4-(7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (23,6 g, 100%) sotto forma di una schiuma di color marrone. LC/MS (APCI+) m/z 377,1 [M+H]<sup>+</sup>.

Fase 7: LiOH-H<sub>2</sub>O (6,577 g, 156,7 mmoli) è stato aggiunto in una soluzione a 0°C di (5R)-terz-butyl 4-(7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (23,6 g, 62,69 mmoli) in THF:H<sub>2</sub>O 2:1 (320 ml). La miscela di reazione è stata agitata per 10 minuti, quindi riportata alla temperatura ambiente. La LC/MS sembrava uguale a 3 ore e a 4,5 ore. La miscela di reazione è stata raffreddata a 0°C, dopo di che alla miscela è stato aggiunto NH<sub>4</sub>Cl saturo. La miscela è stata agitata per 5 minuti, e gran parte del THF è stato rimosso per evaporazione rotativa. La miscela è stata estratta con EtOAc (3 X 250 ml), e gli estratti combinati sono stati essiccati (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati. Il prodotto grezzo è stato spurgato su Biotage 65M: 4:1 di DCM:etil acetato, quindi gradiente da 1:1 a 1:4 di DCM:etil acetato. Una volta che il prodotto stava eluendo, l'etil acetato è stato quindi spurgato attraverso la

colonna. Dopo di che, DCM:MeOH 30:1 eluivano il resto del prodotto (8,83 g). Le frazioni miscelate furono ri-spurgate con Biotage 40 M utilizzando le stesse condizioni per dare altri 2,99 g che hanno dato una resa combinata di (5R)-terz-butil 4-(7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (11,82 g, 56,38% di resa) sotto forma di un schiuma di colore marrone. LC/MS (APCI+) m/z 335,1 [M+H]+.

Fase 8: Una soluzione di DMSO (5,45 ml, 76,8 mmoli) in DCM (50 ml) è stata aggiunta goccia a goccia con un imbuto di addizione in una soluzione a -78°C di ossalil cloruro (3,35 ml, 38,4 mmoli) in DCM (150 ml). La miscela di reazione è stata agitata per 35 minuti, dopo di che una soluzione di (5R)-terz-butil 4-(7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (9,17 g, 27,4 mmoli) in DCM (80 ml) è stata aggiunta lentamente con un imbuto di addizione. La miscela di reazione è stata agitata per un'altra ora a -78°C, dopo di che alla miscela è stata aggiunta trietilammina tale e quale (18,0 ml, 129 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata riportare alla temperatura ambiente, quindi agitata per 30 minuti. E' stata aggiunta H<sub>2</sub>O. La miscela è stata estratta con DCM (3 X 200 ml) e gli estratti combinati sono stati essiccati (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati sottovuoto. Il prodotto grezzo è stato purificato su gel di silice (Biotage 65M), la colonna è stata spurgata con circa 800 ml di DCM:EtOAc 4:1, su gradiente a DCM:etil acetato 1:1 fino a che il prodotto non eluisse, quindi DCM:EtOAc 1:4 eluivano il prodotto per dare (R)-terz-butil 4-(5-metil-7-

osso-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (7,5 g, 82,3% di resa) sotto forma di una schiuma di colore marrone. La schiuma è stata concentrata (3 X) a partire da DCM/esani, il che ha dato una schiuma di colore marrone molto chiaro. HPLC >95% di area. LC/MS (APCI+) m/z 333 [M+H]+.

Fase 9: Trietilammina (4,33 ml, 31,1 mmoli, degassata con azoto per 30 minuti prima dell'uso) e acido formico (1,36 ml, 36,1 mmoli), degassato con azoto 30 minuti prima dell'uso) sono stati aggiunti in una soluzione di (R)-terz-butil 4-(5-metil-7-osso-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (9,75 g, 29,3 mmoli) in DCM (210 ml, degassato con azoto 30 minuti prima dell'uso). La miscela è stata agitata per 5 minuti, dopo di che è stato aggiunto un catalizzatore di Ru (0,0933 g, 0,147 mmoli). La reazione è stata agitata per una notte a pressione d'azoto positiva (18 ore). La miscela di reazione è stata concentrata fino ad essiccamento ed essiccata su vuoto elevato. Il materiale impuro è stato spruzzato su 500 ml di DCM:etil acetato 1:1 caricato su Biotage 65M, spurgato, quindi DCM:etil acetato 1:4 fino ad ottenere il prodotto (2° spot), dopo di che su gradiente di etil acetato tale quale, dopo di che DCM:MeOH 25:1 eluiva il resto del prodotto. Le frazioni sono state combinate e concentrate su evaporatore rotativo. Il residuo è stato concentrato di nuovo a partire da DCM/esani fino a dare una miscela di terz-butil 4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (maggiore) e terz-butil 4-((5R,7S)-7-acetossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-

il)piperazin-1-carbossilato (minore) (9,35 g, 95,3% di resa) sotto forma di una schiuma di colore beige. LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) evidenzia l'88% d.e. per integrazione di carbinolo metina.

Fase 10: 4-nitrobenzoil cloruro (4,27 g, 23,0 mmoli) è stato aggiunto a una soluzione a 0°C di terz-butil 4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (7,0 g, 20,9 mmoli) in THF (4 ml) e trietilammina (4,38 ml, 31,4 mmoli) in DCM (110 ml). La miscela di reazione è stata agitata alla temperatura ambiente per una notte, dopo di che è stato aggiunto NaHCO<sub>3</sub> saturo. La miscela è stata agitata per 10 minuti e poi estratta con DCM. Gli estratti combinati sono stati essiccati (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati. Il prodotto grezzo è stato spruzzato su Biotage 65M (prodotto grezzo caricato su esani:etil acetato 3:1, quindi esani:etil acetato 2:1 hanno eluito terz-butil 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoilossi)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato e poche frazioni miste). Dopo di che, terz-butil 4-((5R,7S)-5-metil-7-(4-nitrobenzoilossi)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato è stato eluito utilizzando esani:etil acetato 1:2. Le frazioni con il prodotto sono state concentrate mediante evaporazione rotativa fino a dare terz-butil 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoilossi)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (8,55 g, 84,5% di resa) sotto forma di una schiuma di colore giallo. LC/MS (APCI+) m/z 484 [M+H]<sup>+</sup>. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>) evidenzia un unico diastereomero. Le

frazioni con un altro diastereomero sono state concentrate per evaporazione rotativa sino a dare *terz*-butil 4-((5R,7S)-5-metil-7-(4-nitrobenzoilossi)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (0,356 g, 3,52% di resa) sotto forma di una schiuma di color marrone. LC/MS (APCI+) m/z 484 [M+H]+.

Fase 11: LiOH-H<sub>2</sub>O (0,499 g, 11,9 mmoli) è stato aggiunto a una soluzione a 0°C di *terz*-butil 4-((5R,7R)-5-metil-7-(4-nitrobenzoilossi)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (2,30 g, 4,76 mmoli) in THF:H<sub>2</sub>O 2:1 (40 ml). La miscela è stata riportata alla temperatura ambiente e agitata per 1 ora. Il THF è stato rimosso per evaporazione rotativa, è stato aggiunto NaHCO<sub>3</sub> saturo, e la miscela è stata estratta con etil acetato. Gli estratti combinati sono stati lavati (1 X) con NaHCO<sub>3</sub> saturo, essiccati (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), filtrati e concentrati fino a dare *terz*-butil 4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (1,59 g, 100,0% di resa) sotto forma di una schiuma di colore giallo. HPLC dopo allestimento del prodotto puro <98% di area, LC/MS (APCI+) m/z 335 [M+H]+. Il *terz*-butil 4-((5R,7S)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato è stato preparato utilizzando un metodo analogo.

Fase 12: HCl/diossano 4M (11,2 ml, 44,9 mmoli) è stato aggiunto a una soluzione di *terz*-butil 4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-carbossilato (0,600 g, 1,79 mmoli) in diossano (15 ml). La miscela di reazione è stata agitata alla temperatura ambiente in azoto per tutta la notte (20

ore). La miscela è stata concentrata fino ad essiccamento ed essiccata su una linea di vuoto elevato. Il prodotto grezzo è stato risospeso in etere, sonicato, e agitato per 5 minuti. Il residuo secco è stato isolato per filtrazione attraverso un imbuto vetroso medio con pressione di azoto, risciacquato con etere, essiccato in pressione di azoto, ed essiccato successivamente su una linea di vuoto elevato sino a dare (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-olo dicloridrato (0,440 g, 79,8% di resa) sotto forma di una polvere di colore giallo. LC/MS (APCI+) m/z 235. Il (5R,7S)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-olo dicloridrato è stato preparato utilizzando un metodo analogo.

Fase 13: Metil 2-(4-clorofenil)acetato (36,7 g, 199 mmoli) e paraformaldeide (6,27 g, 209 mmoli) sono stati dissolti/sospesi in DMSO (400 ml) e trattati con NaOMe (537 mg, 9,94 mmoli). La miscela è stata lasciata agitare alla temperatura ambiente per 2 ore fino a completamento secondo analisi TLC del prodotto grezzo. La reazione è stata versata in acqua fredda di ghiaccio (700 ml; emulsione bianca) e neutralizzata con l'aggiunta di una soluzione di HCl 1 M. Lo strato acquoso è stato estratto con etil acetato (3 X), e i prodotti organici sono stati combinati. Lo strato organico è stato lavato con acqua (2 X), soluzione salina (1 X), separato, essiccato sopra MgSO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato sottovuoto fino ad ottenere il prodotto grezzo sotto forma di un olio di colore giallo. Il residuo è stato caricato su un ampio filtro vetrificato con gel di silice ed eluito con

esani:etil acetato 9:1 fino a che non fosse stato raccolto il materiale di partenza/olefina. Il tampone è stato poi eluito con esani:etil acetato 1:1 fino a che il prodotto utile puro non fosse eluito completamente. Le frazioni pure concentrate hanno dato metil 2-(4-clorofenil)-3-idrossipropanoato sotto forma di un olio incolore (39,4 g, 92%).

Fase 14: Metil 2-(4-clorofenil)-3-idrossipropanoato (39,4 g, 184 mmoli) è stato dissolto in DCM (500 ml) e trattato con TEA (64,0 ml, 459 mmoli). La soluzione è stata raffreddata a 0°C e lentamente trattata con MsCl (15,6 ml, 202 mmoli), quindi lasciata agitare per 30 minuti fino a completamento secondo un'analisi TLC. La soluzione è stata partita con una soluzione di HCl 1N, e lo strato acquoso è stato estratto una volta con DCM. Lo strato organico combinato è stato lavato un'altra volta con soluzione di HCl 1N, separato, lavato con soluzione diluita di NaHCO<sub>3</sub>, e separato. Lo strato organico è stato essiccato sopra MgSO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato sottovuoto per dare un olio di colore arancione. Il residuo è stato caricato su un largo filtro vetrificato con un tampone di gel di silice, ed eluito con esani:etil acetato 9:1 ottenendo il prodotto utile puro secondo un'analisi TLC. Le frazioni pure concentrate hanno dato il metil 2-(4-clorofenil)acrilato sotto forma di un olio incolore (30,8 g, 85%). Questo metil 2-(4-clorofenil)acrilato (500 mg, 2,54 mmoli) è stato aggiunto come una soluzione in THF (1,35 ml) in una soluzione in agitazione di i-PrNH<sub>2</sub> (217 µl, 2,54 mmoli) in THF (5,0 ml) a 0°C. La reazione è stata lasciata agitare a temperatura ambiente per tutta la

notte fino a completamento secondo un'analisi LCMS. Il  $\text{Boc}_2\text{O}$  (584  $\mu\text{l}$ , 2,54 mmoli) è stato aggiunto con una pipetta nell'ammina in agitazione. La reazione è stata lasciata agitare per tutta la notte fino a completamento secondo analisi LCMS e TLC della miscela. La soluzione è stata concentrata sottovuoto fino ad ottenere metil 3-(terz-butossicarbonil(isopropil)ammino)-2-(4-clorofenil)propanoato sotto forma di un olio incolore (854 mg, 94%). LC/MS (APCI+) m/z 256,1 [M-Boc]+.

Fase 15: Metil 3-(terz-butossicarbonil(isopropil)ammino)-2-(4-clorofenil)propanoato (133 g, 374 mmoli) è stato dissolto in THF (1,0 l) e trattato con KOTMS (56,0 g, 392 mmoli) a temperatura ambiente. La miscela è stata lasciata agitare per tutta la notte fino a completamento secondo analisi LCMS del prodotto grezzo. La miscela è stata concentrata sottovuoto fino ad ottenere una schiuma umida, che è stata lasciata essiccare sottovuoto per tutta la notte, sino ad ottenere potassio 3-(terz-butossicarbonil(isopropil)ammino)-2-(4-clorofenil)propanoato sotto forma di un solido di colore bianco (148,7 g, 105%). LC/MS (APCI+) m/z 242,1 [M-Boc-K]+.

Fase 16: Potassio 3-(terz-butossicarbonil(isopropil)ammino)-2-(4-clorofenil)propanoato (77,2 g, 203 mmoli) è stato dissolto in THF (515 ml) e trattato con pivaloil cloruro (26,3 ml, 213 mmoli) alla temperatura ambiente. La miscela è stata lasciata agitare per 3 ore fino a formare l'anidride mista. (S)-4-benzilossazolidin-2-one (46,1 g, 260 mmoli) è stato dissolto in THF (600 ml) e raffreddato fino a  $-78^\circ\text{C}$  in una fiasca separata. La soluzione è stata trattata con n-

BuLi (102 ml di una soluzione 2,50 M in esani, 254 mmoli) e lasciata agitare per 1 ora. La soluzione dell'anidride così preparata è stata aggiunta nel Li-ossazolidinone in agitazione attraverso una cannula, e la miscela è stata lasciata riportare alla temperatura ambiente tutta la notte. La miscela è stata bloccata con l'aggiunzione di una soluzione satura di cloruro di ammonio, quindi partita tra più acqua ed etil acetato. Lo strato acquoso è stato estratto per parecchie volte, e i prodotti organici sono stati combinati. Lo strato organico è stato lavato con acqua, quindi soluzione salina, separato sopra  $MgSO_4$ , filtrato e concentrato sottovuoto. Il residuo è stato purificato/separato (diastereomeri) attraverso una cromatografia (gel di silice eluito con esani:etil acetato 4:1) fino ad ottenere i diastereomeri separati completamente sotto forma di oli viscosi: *terz-butil (R)-3-((S)-4-benzil-2-ossoossazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-ossopropil(isopropil)carbammato* (12,16 g, 24% in base a 1/2 di racemato di acido) e *terz-butil (S)-3-((S)-4-benzil-2-ossoossazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-ossopropil(isopropil)carbammato* (39,14 g, 77% in base a 1/2 di racemato di acido). LC/MS (APCI+) m/z 401,2 [M-Boc]+.

Fase 17: LiOH-H<sub>2</sub>O (168 mg, 4,00 mmoli) è stato aggiunto a una soluzione in agitazione di THF (30 ml) ed acqua (15 ml) alla temperatura ambiente fino a che non fosse dissolto. La miscela è stata trattata con perossido di idrogeno (658 µl di una soluzione al 35% p in acqua, 8,00 mmoli) e lasciata agitare alla temperatura ambiente per 10 minuti. La reazione è stata raffreddata a 0°C in una

vaschetta con ghiaccio, ed è stato aggiunto terz-butyl (S)-3-((S)-4-benzil-2-ossoossazolidin-3-il)-2-(4-clorofenil)-3-ossopropil(isopropil)carbammato (1,00 g, 2,00 mmoli) goccia a goccia con un imbuto di addizione come una soluzione in THF (15 ml) nell'arco di 10 minuti. La miscela è stata lasciata agitare per una notte a temperatura ambiente fino a completamento secondo analisi LCMS del prodotto grezzo. La reazione è stata raffreddata a 0°C, quindi trattata con soluzione di Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M (9,00 ml) attraverso un imbuto di addizione, nell'arco di un periodo di 10 minuti. Dopo che l'addizione fosse completa, la miscela è stata riportata alla temperatura ambiente per 10 minuti. La miscela è stata concentrata per rimuovere il THF, quindi diluita con acqua. Lo strato acquoso è stato lavato due volte con etil acetato (scartato). Lo strato acquoso è stato spartito con etil acetato, quindi trattato goccia a goccia agitando con HCl 1M fino a che non si ottenesse un pH pari a 2-3. Lo strato acquoso è stato estratto per due volte con etil acetato, e i prodotti organici sono stati combinati. Il prodotto organico è stato lavato con soluzione salina, separato, essiccato sopra MgSO<sub>4</sub>, filtrato e concentrato sottovuoto. Il prodotto in olio incolore è stato essiccato sotto un vuoto elevato per 1 ora, fino ad ottenere acido (S)-3-(terz-butossicarbonil(isopropil)ammino)-2-(4-clorofenil)propa-noico sotto forma di un olio/schiuma viscosi (685 mg, 100%). LC/MS (APCI+) m/z 242,1 [M-Boc]+.

Fase 18: Una soluzione di (5R,7R)-5-metil-4-(piperazin-1-il)-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-7-olo dicloridrato (2,92 g, 9,51

mmoli) e acido (S)-3-(terz-butossicarbonil(isopropil)ammino)-2-(4-clorofenil)propanoico (3,25 g, 9,51 mmoli) in DCM (40 ml) e DIEA (5,0 ml, 28,7 mmoli) è stata agitata alla temperatura ambiente per 10 minuti. Alla miscela è stato aggiunto HBTU (3,61 g, 9,51 mmoli). La miscela è stata agitata per 1 ora alla temperatura ambiente. Il solvente è stato rimosso, e il residuo è stato dissolto in etil acetato (500 ml) e lavato con acqua (6 X 100 ml). La fase organica è stata essiccata e concentrata. Il residuo è stato sottoposto a cromatografia su colonna, eluito mediante EtOAc-DCM/MeOH (20:1) per dare terz-butil (S)-2-(4-clorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-ossopropil(isopropil)carbammato (3,68 g, 69%). LC/MS (APCI+) m/z 558,2 [M+H]+.

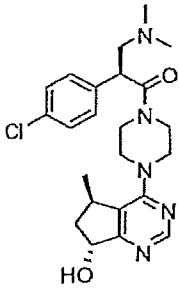
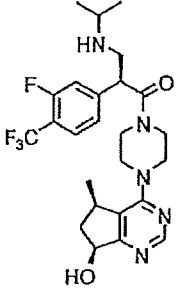
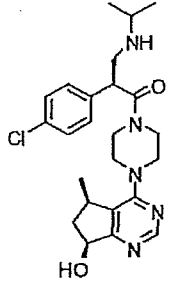
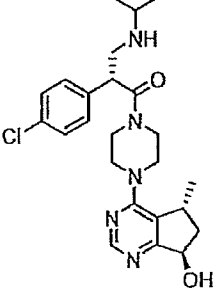
Fase 19: Il terz-butil (S)-2-(4-clorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-ossopropil(isopropil)carbammato (2,50 g, 4,48 mmoli) è stato dissolto in diossano (22,4 ml) e trattato con HCl 4M in diossano (22,4 ml, 89,6 mmoli) a temperatura ambiente. La soluzione risultante è stata lasciata agitare per una notte fino a completamente secondo analisi LCMS del prodotto grezzo. La soluzione è stata concentrata sottovuoto fino ad ottenere un gel che è stato dissolto a una quantità minima di metanolo (10 ml). La soluzione è stata trasferita con una pipetta in etere agitato (300 ml) fino ad ottenere un precipitato bianco del prodotto utile. L'addizione è stata di circa la metà quando il precipitato bianco si fondeva in un gel di colore giallo. Il materiale è stato concentrato sottovuoto fino ad ottenere

un gel giallo che è stato lasciato a riposo per una notte a pressione ridotta fino ad ottenere (S)-2-(4-clorofenil)-3-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilammino)propan-1-one dicloridrato sotto forma di una polvere di colore giallo (2,14 g, 90%).

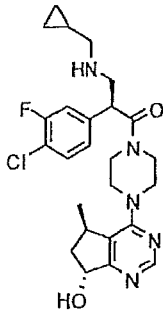
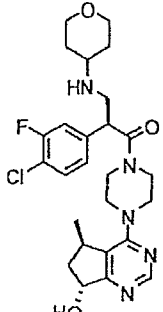
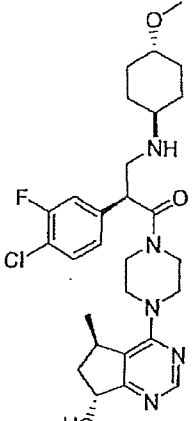
<sup>1</sup>H NMR (D<sub>2</sub>O, 400 MHz) δ 8.39 (s, 1H), 7.37-7.35 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 7.23-7.20 (d, J = 8.4 Hz, 2H), 5.29-5.25 (m, 1H), 4.33-4.29 (m, 1H), 4.14-4.10 (m, 1H), 3.89-3.19 (m, 11H), 2.23-2.17 (m, 1H), 2.08-1.99 (m, 1H), 1.20-1.18 (m, 6H), 0.98-0.96 (d, J = 6.8 Hz, 3H). MS (APCI+) [M+H]<sup>+</sup> 458.

Gli esempi 3-9 mostrati in Tabella 1 possono anche essere prodotti secondo i metodi sopra descritti. Gli esempi 3-9 sono tutti esempi comparativi.

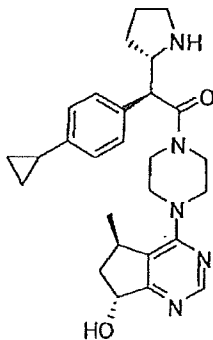
Tabella 1

Esempio comparativo	Struttura	Nome	LCMS o <sup>1</sup> H NMR
3		(S)-2-(4-clorofenil)-3-(dimetilammino)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)propan-1-one	444.1
4		(S)-2-(3-fluoro-4-(trifluorometil)-fenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilammino)propan-1-one	510.3
5		(S)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilammino)propan-1-one	458.3
6		(R)-2-(4-clorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(isopropilammino)propan-1-one	458

(continuazione)

Esempio comparativo	Struttura	Nome	LCMS o <sup>1</sup> H NMR
7		(S)-2-(4-cloro-3-fluorofenil)-3-(ciclopropilmetilammino)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)propan-1-one.	LCMS (APCI+) m/z 488, 490 [M+H] <sup>+</sup>
8		(S)-2-(4-cloro-3-fluorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-(tetraidro-2H-piran-4-ilammino)propan-1-one	LCMS (APCI+) m/z 518, 520 [M+H] <sup>+</sup>
9		(S)-2-(4-cloro-3-fluorofenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-3-((1R,4S)-4-metossicicloesilammino)propan-1-one	LCMS (APCI+) m/z 546

Esempio 10 (Esempio comparativo)



(S)-2-(4-ciclopropilfenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-((S)-pirrolidin-2-il)etanone

Fase 1: Ciclopropilmagnesio bromuro (64,0 ml, 32,00 mmoli) in THF è stato trattato con una soluzione di cloruro di zinco(II) (64,00 ml, 32,00 mmoli) in THF. La miscela è stata agitata alla temperatura ambiente per 20 minuti. Sono stati aggiunti 2-(4-bromofenil)-acetonitrile (5,228 g, 26,67 mmoli) e bis[tri-t-butilfosfina]-palladio (0,6814 g, 1,333 mmoli) come soluzione in THF (2 ml). La reazione è stata agitata alla temperatura ambiente sotto azoto per 12 ore. La reazione è stata bloccata con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  saturo, diluita con cloruro di metilene e separata. Lo strato acquoso è stato lavato con cloruro di metilene (2 X), dopo di che gli strati organici combinati sono stati lavati con acqua (3 X), essiccati sopra  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e concentrati sottovuoto. Il prodotto grezzo è stato sottoposto a cromatografia su  $\text{SiO}_2$  eluendo con esani/etil acetato 25:1 fino ad ottenere 2-(4-ciclopropilfenil)acetonitrile (2,76 g, 66%).

$^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz)  $\square$  7.20 (d,  $J = 8.2$ , 2H), 7.07 (d,  $J = 8.2$ , 2H), 3.70 (s, 2H), 1.94-1.85 (m, 1H), 1.01-0.95 (m, 2H), 0.71-0.66 (m, 2H).

Fase 2: Metanolo (65 ml) è stato raffreddato fino a  $0^\circ\text{C}$  e reso

saturo con HCl (g). Questa soluzione è stata trattata con una soluzione di 2-(4-ciclopropilfenil)acetonitrile (2,76g, 17,56 mmoli) in metano (6 ml). La miscela di reazione è stata riscaldata fino a riflusso per tutta la notte in una provetta di essiccamento contenente CaSO<sub>4</sub>. La reazione è stata raffreddata e concentrata sottovuoto. La miscela grezza è stata risospesa in etil acetato ed acqua e poi separata. Lo strato organico è stato lavato con NaHCO<sub>3</sub> saturo, NaCl saturo, essiccato sopra Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrato sotto vuoto fino a dare metil 2-(4-ciclopropilfenil)acetato in forma oleosa (3,10 g, 93%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.16 (d, J = 8.3, 2H), 7.02 (d, 2H), 3.68 (s, 3H), 3.58 (s, 2H), 1.92-1.83 (m, 1H), 0.97-0.91 (m, 2H), 0.70-0.64 (m, 2H).

Fase 3: Metil 2-(4-ciclopropilfenil)acetato (3,10 g, 16,30mmoli) è stato dissolto in una miscela di THF/MeOH/acqua (2:2:1, 80 ml), e la soluzione è stata trattata con idrossido di litio idrato (0,8548 g, 20,37 mmoli). La miscela è stata poi agitata alla temperatura ambiente per 4 ore. La miscela di reazione è stata neutralizzata fino a pH 4 con HCl 3N e concentrata sottovuoto. Il residuo secco è stato ridissolto in etil acetato ed acqua. Il pH è stato ri-aggiustato fino a un pH tra circa 3 e circa 4 con HCl 3N. Gli strati sono stati poi separati. Lo strato acquoso è stato lavato con etil acetato (2 X). Gli strati organici combinati sono stati poi lavati con NaCl saturo, essiccato sopra Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrati per ottenere acido 2-(4-ciclopropilfenil)acetico (2,82 g, 98%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) δ 7.16 (d, J = 8.2, 2H), 7.03 (d, 2H), 3.60 (s, 2H), 1.92-1.83 (m, 1H), 0.98-0.91 (m, 2H), 0.70-0.64 (m, 2H).

Fase 4: Acido 2-(4-ciclopropilfenil)acetico (2,82 g, 16,003

mmoli) è stato combinato con (R)-4-benzilossazolidin-2-one (3,4030 g, 19,204 mmoli) in toluene (14 ml). La sospensione è stata trattata con trietilammina e poi riscaldata fino a 80°C. La soluzione è stata trattata goccia a goccia con una soluzione di pilavoil cloruro (1,9893 ml, 16,003 mmoli) in toluene (3,5 ml). La reazione è stata riscaldata per una notte a 80°C. La reazione è stata raffreddata e lavata con HCl 2N e poi separata. Lo strato acquoso è stato lavato con toluene, e i prodotti organici combinati sono stati poi lavati con HCl 2N, acqua, NaHCO<sub>3</sub> saturo (2 X), NaCl saturo, essiccati sopra Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e concentrati sottovuoto. Il prodotto grezzo è stato sottoposto a cromatografia su SiO<sub>2</sub> eluendo con esani/etil acetato 9:1 fino a ottenere (R)-4-benzil-3-(2-(4-ciclopropilfenil)acetil)ossazolidin-2-one (3,43 g, 64%).

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) □ 7.33-7.20 (m, 5H), 7.16-7.11 (m, 2H), 7.05 (d, J = 8.2, 2H), 4.70-4.63 (m, 1H), 4.32-4.14 (m, 4H), 3.26 (dd, J<sub>1</sub> = 3.2, J<sub>2</sub> = 13.3, 1H), 2.75 (dd, J<sub>1</sub> = 9.5, J<sub>2</sub> = 13.3, 1H), 1.93-1.85 (m, 1H), 0.98-0.92 (m, 2H), 0.72-0.66 (m, 2H).

Fase 5: Acido (S)-2-((S)-1-(terz-butossicarbonil)pirrolidin-2-il)-2-(4-ciclopropilfenil)acetico è stato preparato secondo la procedura descritta per l'esempio 1, utilizzando (R)-4-benzil-3-(2-(4-ciclopropilfenil)acetil)ossazolidin-2-one (0,287 g, 26%). MS (ESI+) [M+H] 345,7.

Fase 6: (S)-terz-butyl 2-((S)-1-(4-ciclopropilfenil)-2-(4-((5R, 7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)pipe-razin-1-il)-2-ossoetil)pirrolidin-1-carbossilato è stato preparato secondo la procedura descritta per l'esempio 3 utilizzando acido (S)-2-((S)-1-(terz-butossicarbonil)pirrolidin-2-il)-2-(4-ciclopropilfe-

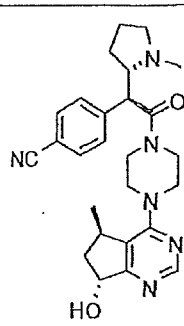
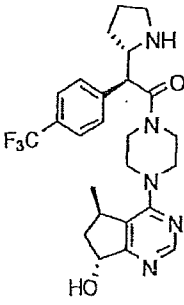
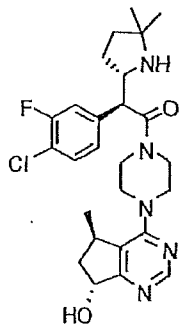
nil)acetico (0,199 g, 94%). MS (ESI+) [M+H] 562,1.

Fase 7: (S)-2-(4-ciclopropilfenil)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-((S)-pirrolidin-2-il)etanone preparato secondo la procedura descritta per l'esempio 3 utilizzando (S)-terz-butyl 2-((S)-1-(4-ciclopropilfenil)-2-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-ossoetil)pirrolidin-1-carbossilato (0,145 g, 77%).

MS (ESI+) [M+H] 462.2. <sup>1</sup>H NMR (CD3OD, 400 MHz) □ 8.56 (s, 1H), 7.26 (d, 2H), 7.13 (d, 2H), 5.29 (dd, 1H), 5.32-5.26 (dd, 1H), 4.32 (d, 1H), 4.29-4.18 (m, 1H), 4.12-3.95 (m, 2H), 3.88-3.61 (m, 6H), 3.51-3.38 (m, 1H), 3.35-3.30 (m, 1H), 2.32-2.24 (m, 1H), 2.22-2.03 (m, 2H), 1.95-1.85 (m, 2H), 1.82-1.73 (m, 2H), 1.40-1.34 (m, 1H), 1.16 (d, 3H), 1.01-0.95 (m, 2H), 0.69-0.64 (m, 2H).

Gli esempi in Tabella 2 possono anche essere prodotti secondo i metodi sopra descritti. Gli esempi 11-13 sono tutti esempi comparativi.

Tabella 2

Esempio comparativo	Struttura	Nome	LCMS o <sup>1</sup> H NMR
11		4-((S)-2-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidin-4-il)-piperazin-1-il)-1-((S)-1-metilpirrolidin-2-il)-2-ossoetil)benzotrile	m/z 461.3; <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO-D6) d ppm 8.65 (s, 1H), 7.85 (d, 2H), 7.65 (d, 2H), 5.10 (t, 1H), 4.80 (d, 1H), 4.10-3.85 (m, 5H), 3.68 (m, 2H), 3.40 (m, 2H), 2.90 (s, 3H), 2.20-2.02 (m, 2H), 1.93 (m, 2H), 1.68 (m, 1H), 1.50 (m, 1H), 1.35-1.25 (m, 11H), 1.10 (d, 3H)
12		(S)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-2-((S)-pirrolidin-2-il)-2-(4-(trifluorometil)fenil)etanone	m/z 490.3; <sup>1</sup> H NMR (500 MHz, DMSO-D6) d ppm 9.18 (m, 1H), 8.85 (m, 1H), 8.57 (s, 1H), 7.78 (d, 2H), 7.62 (d, 2H), 5.04 (t, 1H), 4.48 (d, 1H), 4.02 (m, 2H), 3.95 (m, 2H), 3.75-3.50 (m, 6H), 3.42 (m, 2H), 3.30-3.10 (m, 4H), 2.10-1.90 (m, 3H), 1.75 (m, 1H), 1.70-1.50 (m, 2H), 1.04 (d, 3H)
13		(S)-2-(4-cloro-3-fluorofenil)-2-((S)-5,5-dimetilpirrolidin-2-il)-1-(4-((5R,7R)-7-idrossi-5-metil-6,7-diidro-5H-ciclopenta[d]-pirimidin-4-il)piperazin-1-il)-etanone	LCMS (apci+) 502 [M+H] <sup>+</sup> ; 2.68 min; HPLC r.t.= 1.98min, >97% purezza; <sup>1</sup> H NMR (400MHz, D <sub>2</sub> O) d ppm 8.37 (s, 1H), 7.43 (t, J=8.2Hz, 1H), 7.16 (d, J=9.8Hz, 1H), 7.06 (d, J=8.2Hz, 1H), 5.24 (t, J=7.8Hz, 1H), 4.27 (d, J=9.4Hz, 1H), 4.22-4.02 (m, 1H), 3.88-3.75 (m, 2H), 3.72-3.60 (m, 1H), 3.59-3.41 (m, 4H), 3.37-3.22 (m, 1H), 2.24-2.11 (m, 0.5H), 2.10-1.94 (m, 0.5H), 1.89-1.71 (m, 4H), 1.36 (s, 3H), 1.30 (s, 3H), 0.96 (d, J=7.0Hz, 3H)

Esempio 14. Analisi sulla proliferazione cellulare *in vitro* (Esempio di riferimento)

La potenza *in vitro* delle combinazioni del composto di esempio 2 con alcuni specifici agenti chemioterapici è stata misurata utilizzando l'analisi per la vitalità cellulare a luminescenza CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay, disponibile in commercio dalla Promega Corp., Madison, WI. Questo metodo di analisi omogenea si basa sull'espressione ricombinante di luciferasi di

*Coleoptera* (US 5583024; US 5674713; US 5700670) e determina il numero di cellule vitali in una coltura in base alla quantificazione della ATP presente, un indicatore di cellule metabolicamente attive (Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88; US 6602677). L'analisi CellTiter-Glo® è stata condotta in un formato da 96 oppure 384 pozzetti, rendendola disponibile a un'analisi automatizzata ad alto rendimento (HTS) (Cree et al (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404). La procedura di analisi omogenea comporta l'aggiunzione di un singolo reagente (reagente CellTiter-Glo®) direttamente nelle cellule poste in coltura in un mezzo supplementato da siero. Non sono richiesti il lavaggio delle cellule, la rimozione del mezzo, né più fasi di pipettamento. Il sistema rivela tante cellule quanto fino a 15 cellule/pozzetto in un formato da 284 pozzetti entro 10 minuti, dopo aver aggiunto il reagente ed avere miscelato.

Il formato omogeneo "add-mix-measure (aggiunzione-miscelazione-misurazione)" porta come risultato a lisi di cellule e generazione di un segnale luminescente proporzionale alla quantità di ATP presente. La quantità di ATP è direttamente proporzionale al numero di cellule presenti in coltura. L'analisi CellTiter-Glo® genera un segnale luminescente "di tipo incandescente" prodotto dalla reazione della luciferasi, che ha un tempo di dimezzamento generalmente maggiore di 5 ore, a seconda del tipo di cellule e del mezzo utilizzato. Le cellule vitali si riflettono in unità di luminescenza relativa (RLU). Il substrato, luciferina di maggiolino, è decarbossilato per via ossidativa attraverso la luciferasi di lucciola con una conversione

concomitante di ATP in AMP e generazione di fotoni. Il tempo di dimezzamento prolungato elimina la necessità di impiegare iniettori di reagenti e produce flessibilità per un processamento in modalità continua o discontinua di più piastre. Questa analisi sulla proliferazione cellulare può essere utilizzata con diversi formati multipozzetto, per esempio un formato da 96 oppure da 384 pozzetti. I dati possono essere registrati al luminometro e con un dispositivo per la creazione di immagini su camera CCD. L'esito della luminescenza viene presentato in unità luminose relative (RLU), misurate nel tempo.

Gli effetti anti-proliferativi di combinazioni tra il composto di esempio 2 ed alcuni agenti chemioterapici possono essere misurati utilizzando l'analisi CellTiter-Glo®. I valori della IC<sub>50</sub> sono stati stabiliti per i composti analizzati e le combinazioni. L'intervallo di attività di potenza cellulare *in vitro* è stato tra circa 100 nM e circa 10 µM.

#### **Esempio 15. Efficacia di uno xenotrapianto di tumore *in vivo***

L'efficacia di combinazioni rappresentative dell'invenzione si può misurare *in vivo* impiantando allotrapianti oppure xenotrapianti di cellule cancerose nei roditori e trattando gli animali recanti il tumore con le combinazioni. Ci si deve aspettare risultati variabili a seconda della linea di cellule, della presenza o assenza di alcune mutazioni nelle cellule tumorali, della sequenza di somministrazione del composto di esempio 2 e dell'agente chemioterapico, del regime di dosaggio e di altri fattori. I topi in oggetto sono stati trattati

con il o i farmaci oppure un controllo (veicolo) e monitorati nell'arco di parecchie settimane o per un periodo superiore con lo scopo di misurare il tempo di raddoppiamento del tumore, l'uccisione delle cellule su base logaritmica, e l'inibizione del tumore.

I risultati per combinazioni rappresentative dell'invenzione che sono state analizzate in tale modello sono presentati nelle figure 1-2.

I dati nelle figure dimostrano che le combinazioni rappresentative producono risultati migliori rispetto alla somministrazione dei singoli rispettivi agenti.

E' stato determinato che alcune combinazioni dell'invenzione producono effetti migliori contro alcuni fenotipi di cancro. Per esempio, alcune combinazioni dell'invenzione producono effetti migliori contro cancri associati a una mutazione di PTEN, una mutazione di AKT (per esempio sovraespressione oppure amplificazione), una mutazione di PI3K, oppure un'amplificazione di Her2/ErbB2. Di conseguenza, alcune combinazioni qui descritte possono essere particolarmente utili contro tre tipi di cancro. Per esempio, nel cancro gastrico, la perdita di picchi PTEN prevede una migliore efficacia con alcune combinazioni dell'invenzione (per esempio un composto di formula I insieme a 5-FU/cisplatino), e nel cancro prostatico si è osservato un effetto più forte per una combinazione tra un composto di formula I e docetaxel in linee PTEN nulle.

Lo stato PTEN può essere misurato con qualsiasi mezzo appropriato noto nel campo. In un esempio, viene utilizzato IHC. In alternativa, può essere utilizzata un'analisi Western blot. Anticorpi

rivolti contro PTEN sono disponibili in commercio (Cell Signaling Technology, Beverly, MA, Cascade Biosciences, Winchester, MA). Le procedure rappresentative per un'analisi IHC e Western blot per lo stato PTEN sono descritte in Neshat, M.S. et al. Enhanced sensitivity of PTEN-deficient tumors to inhibition of FRAP/mTOR, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98, 10314-10319 (2001) e Perren, A., et al. Immunohistochemical Evidence of Loss of PTEN Expressing in Primary Ductal Adenocarcinomas of the Breast, American Journal of Pathology, Vol. 155, No. 4, October 1999. Inoltre, cancro associati a una mutazione di AKT, una mutazione di PI3K, e un'amplificazione o mutazione di Her2/ErbB2 possono essere identificati utilizzando tecniche note nel campo. In un esempio, lo stato di PTEN di un paziente o di un campione di tessuto viene determinato utilizzando la IHC, e un punteggio istologico o HScore (punteggio H) verrà assegnato al campione o paziente. Un esempio di un modo di calcolare il punteggio H utilizza la formula:  $\text{punteggio H o HScore} = (\%1 + \text{cellule} \times 1) + (\%2 + \text{cellule} \times 2) + (\%3 + \text{cellule} \times 3)$  (si veda Shoman, N. et al. Mod Path (2005) 18, 250-259). Un punteggio H di PTEN medio di un tessuto non-canceroso proveniente dallo stesso paziente o da un insieme di pazienti può essere utilizzato per determinare se i punteggi del paziente o del campione siano bassi o nulli. In un esempio, punteggi H minori di 200 sono ritenuti bassi e corrispondono a PTEN basso, e punteggi H di circa 0 sono ritenuti nulli. Un aspetto include un composto in una combinazione come definita nella rivendicazione 1 per l'impiego nell'inibizione della crescita tumorale (TGI) in un

paziente colpito da un cancro che comprenda una mutazione di PTEN. Una mutazione di AKT (per esempio, sovraespressione oppure amplificazione), una mutazione di PI3K, oppure un'amplificazione o mutazione di Her2/ErbB2. In alcune forme di realizzazione, la combinazione sarà sinergica. In alcune forme di realizzazione, la TGI della combinazione sarà maggiore della TGI di GDC-0068 oppure del solo abiraterone. In alcune forme di realizzazione, la TGI della combinazione sarà circa il 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 o 75 per cento maggiore della TGI di GDC-0068 o del solo abiraterone.

Metodi per misurare la TGI sono risaputi nel campo. In un metodo rappresentativo, i volumi medi del tumore sono determinati e comparati dai pazienti prima e dopo trattamento. I volumi dei tumori possono essere misurati in due dimensioni (lunghezza e larghezza) utilizzando qualsiasi metodo presente nel campo, per esempio calibri UltraCal IV (Fred V. Fowler Company) oppure attraverso una PET (tomografia ad emissione di positroni), altrimenti con qualsiasi altro metodo. Può essere utilizzata la formula: volume del tumore ( $\text{mm}^3$ ) = Lunghezza x larghezza<sup>2</sup> x 0,5. La misurazione dei volumi del tumore nell'arco di più periodi di tempo può essere eseguita utilizzando un approccio su effetti lineari misti (Linear Mixed Effects (LME) (Pinheiro et al. 2009) a creazione di modelli misti. Questo approccio può indirizzare entrambe le misurazioni ripetute (e più pazienti). Profili di regressione cubica possono essere utilizzati per adeguare un profilo non-lineare negli andamenti nel

tempo del volume di tumore ad ogni livello di dose. Questi profili non-lineari possono essere poi correlati alla dose entro un modello misto. L'inibizione della crescita del tumore come percentuale di veicolo può essere calcolata in percentuale di area sotto alla curva aggiustata (area under the fitted curve (AUC)) al di rispetto al veicolo, utilizzando la seguente formula:

$$\% \text{ TGI} = 100 \left[ 1 - \left( \frac{\text{AUC}_{\text{trattamento/giorno}}}{\text{AUC}_{\text{veicolo/giorno}}} \right) \right]$$

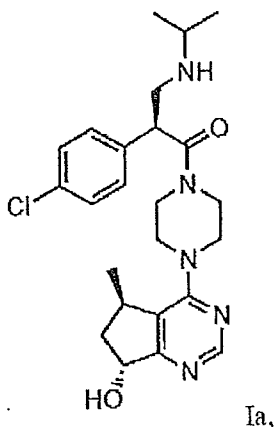
Utilizzando questo tipo di formula, un valore TGI pari al 100% indicherà stasi del tumore, maggiore di circa l'1% ma minore di circa il 100% indicherà inibizione della crescita del tumore, e maggiore di circa il 100% indicherà regressione del tumore.

In alcune forme di realizzazione, il cancro comprende una o più mutazioni di AKT, PI3K, PTEN e HER2 oppure una segnalazione aberrante di AKT, PI3K, PTEN o HER2. Un aspetto specifico include un composto in una combinazione come definita alla rivendicazione 1 per impiego nel trattamento di un paziente con un cancro che sia associato a una mutazione di PTEN o perdita della sua espressione, una mutazione o amplificazione di AKT, una mutazione o amplificazione di PI3K oppure un'amplificazione di Her2/ErbB2. In un altro esempio, il cancro da trattare sarà associato a stato PTEN-positivo, basso o nullo in combinazione a stato HER2-positivo o negativo.

\* \* \* \* \*

## R I V E N D I C A Z I O N I

1. Composto di formula Ia:



in combinazione a abiraterone per impiego nel trattamento terapeutico di un disordine iperproliferativo, dove il disordine iperproliferativo è cancro alla prostata.

2. Composto in combinazione per impiego di rivendicazione 1, dove il composto di formula Ia è per somministrazione contemporanea con abiraterone.

3. Composto in combinazione per impiego di rivendicazione 1, dove il composto di formula Ia è per somministrazione in sequenza con abiraterone.

4. Composto in combinazione per impiego di rivendicazione 1, dove il composto di formula Ia e abiraterone sono per somministrazione separatamente.

5. Composto in combinazione per impiego di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, dove il cancro è associato a mutazione di PTEN.

6. Composto in combinazione per impiego di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, dove il cancro è associato a mutazione,

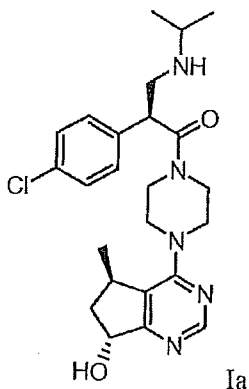
sovraespressione oppure amplificazione di AKT.

7. Composto in combinazione per impiego di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, dove il cancro è associato a mutazione di PI3K.

8. Composto in combinazione per impiego di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, dove il cancro è associato a mutazione di Her2/ ErbB2.

9. Composto in combinazione per impiego di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, dove la combinazione produce un effetto sinergico nel trattamento del disordine iperproliferativo, dove opzionalmente il valore dell'indice di combinazione dell'effetto sinergico è minore di circa 0,8.

10. Composto di formula Ia



per utilizzo terapeutico per migliorare la qualità di vita di un paziente trattato per un cancro alla prostata con abiraterone.

11. Composto in combinazione per impiego di una qualsiasi delle rivendicazioni 1-4, dove detto cancro alla prostata è cancro alla prostata resistente alla castrazione (CRPC).

Dogana, 18 maggio 2018

In fede

Il Mandatario  
Ing. Marco Montebelli

USBM CPI 001

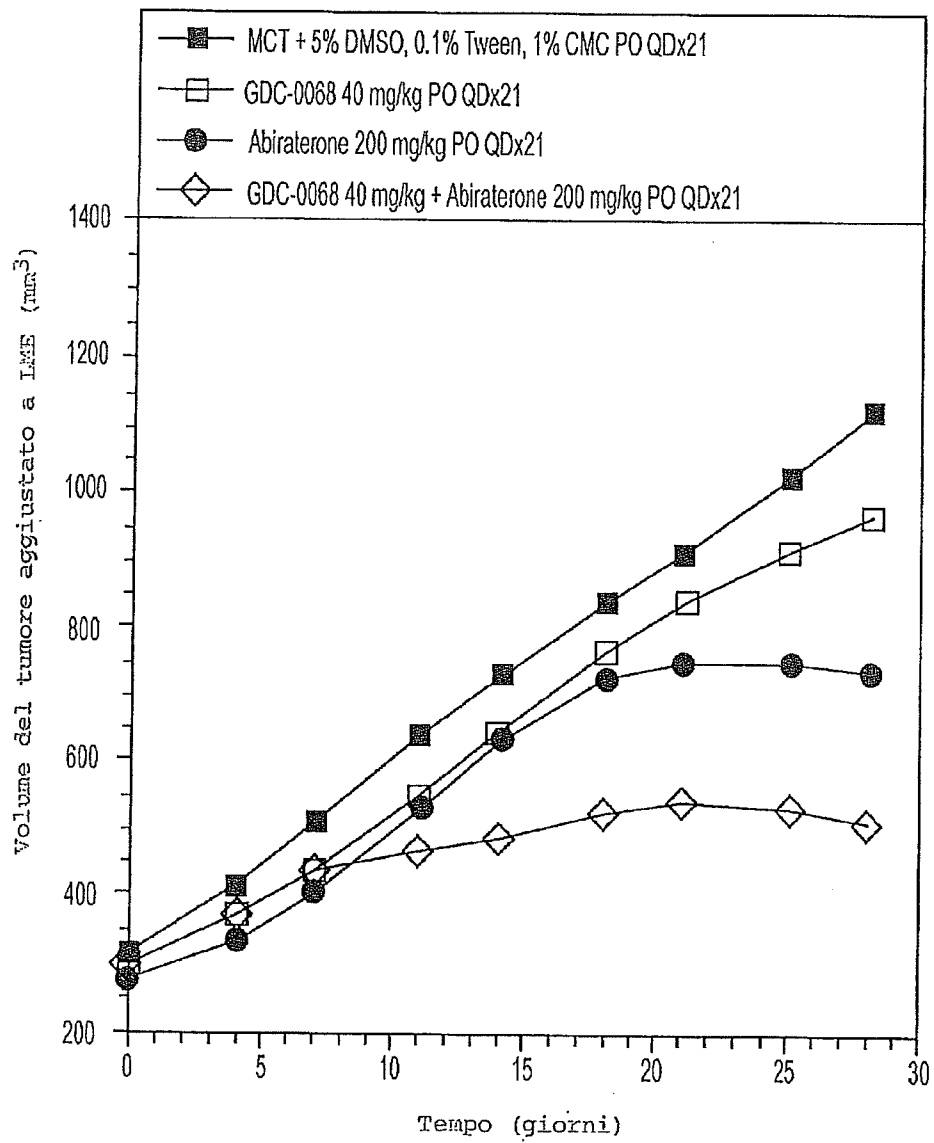


FIG. 1

  
 Ing. Marco MONTEBELLI  
 USBM CPI 001

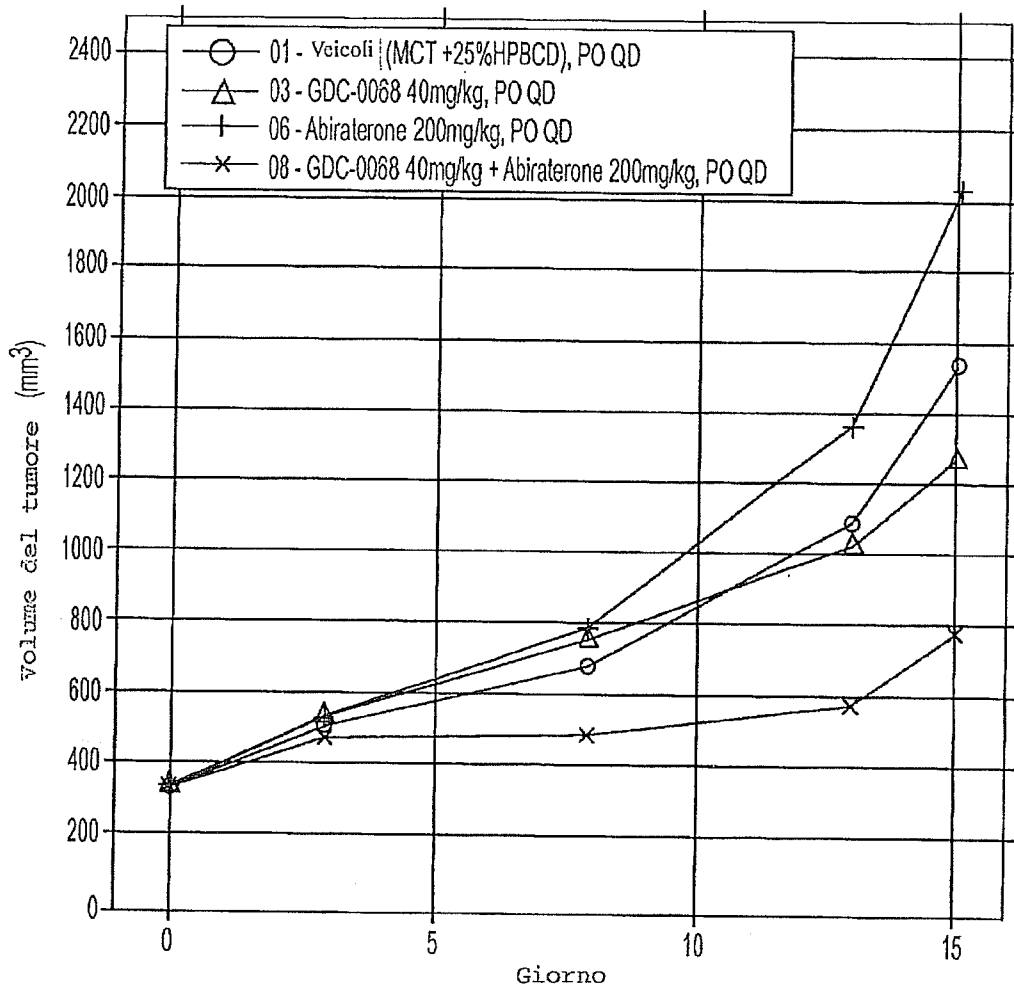
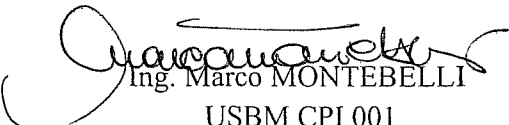


FIG. 2

  
 Ing. Marco MONTEBELLI  
 USBM CPI 001