

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3630761

DAL TITOLO:

“INIBITORI DI KRAS G12C E METODI DI USO DEGLI STESSI”

*** **

Descrizione

CAMPO DELL'INVENZIONE

[0001] Nel presente documento sono forniti inibitori di KRAS G12C, composizione degli stessi e metodi di uso degli stessi. Questi inibitori sono utili per l'uso nel trattamento di una serie di disturbi, inclusi cancri pancreatici, del colon-retto e polmonari.

Stato dell'arte

[0002] Le mutazioni del gene di KRAS sono comuni in cancro pancreatico, adenocarcinoma polmonare, cancro del colon-retto, cancro della cistifellea, cancro della tiroide e cancro del dotto biliare. Le mutazioni di KRAS sono anche osservate in circa il 25% dei pazienti con NSCLC, e alcuni studi hanno indicato che le mutazioni di KRAS sono un fattore prognostico negativo in pazienti con NSCLC. Recentemente, mutazioni di omologo di oncogene virale del sarcoma di ratto V-Ki-ras2 (KRAS) sono state riscontrate conferire resistenza a terapie mirate a recettore di fattore di crescita epidermico (EGFR) in cancro del colon-retto; di conseguenza, lo stato mutazionale di KRAS può fornire informazioni importanti prima della prescrizione della terapia di TKI. Presi insieme, vi è la necessità di nuovi trattamenti medici per pazienti con cancro pancreatico, adenocarcinoma polmonare o cancro

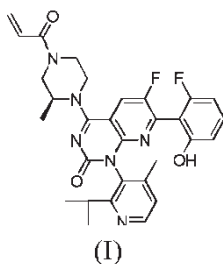
del colon-retto, specialmente quelli che sono stati diagnosticati avere tali cancri caratterizzati da una mutazione di KRAS, e inclusi quelli che sono progrediti dopo la chemioterapia.

WO2015054572 A1 divulga composti aventi attività come inibitori della proteina di KRAS mutante G12C.

WO2019213516A1 divulga inibitori di KRAS G12C, composizione degli stessi e metodi di uso degli stessi.

Sommario

[0003] Nel presente documento sono forniti composti aventi una struttura di formula (I)



o un suo atropisomero, un suo sale farmaceuticamente accettabile o un sale farmaceuticamente accettabile del suo atropisomero.

I composti divulgati nel presente documento possono essere sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile. I composti forniti possono essere formulati in una formulazione farmaceutica comprendente un composto divulgato nel presente documento e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

[0004] Viene fornito anche un metodo *in vitro* per inibire KRAS G12C in una cellula, comprendente mettere a contatto la cellula con un

composto o una composizione divulgati nel presente documento. È inoltre fornito che i composti divulgati nel presente documento sono per uso come medicinale, nel trattamento di cancro in un soggetto comprendente somministrare al soggetto una quantità terapeuticamente efficace di un composto o una composizione divulgati nel presente documento. In alcune forme di realizzazione, il cancro è cancro polmonare, cancro pancreatico o cancro del colon-retto.

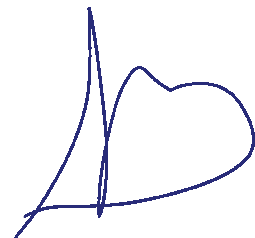
Descrizione dettagliata

Definizioni

Abbreviazioni: Nel presente documento, possono essere usate le seguenti abbreviazioni:

AcOH	acido acetico
aq o acq.	Acquoso
BOC o Boc	t-butilossicarbonile
cpme	ciclopentil metil etere
DCE	1,2-dicloroetano
DABCO	1,4-diazabicyclo[2.2.2]ottano
DCM	Diclorometano
DMA	N,N-dimetilacetammide
DMAP	4-dimetilamminopiridina
DME	1,2-dimetossietano
DMF	N,N-dimetilformammide
DMSO	dimetilsolfossido
Dppf, DPPF o dppf	1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocene

eq o eq. o equiv.	Equivalentente
ESI o ES	ionizzazione elettrospray
Et	Etile
Et ₂ O	dietil etere
EtOAc	etil acetato
g	Grammi
h	Ora
HPLC	cromatografia liquida ad alta pressione
iPr	Isopropile
iPr ₂ NEt o DIPEA	N-etil diisopropilammina (base di Hunig)
KHMDS	esametildisilazide di potassio
KOAc	acetato di potassio
reagente di Lawesson	2,4-bis(4-metossifenil)-2,4-ditiosso-1,3,2,4-ditiadifosfetano, 2,4-bis-(4-metossifenil)-1,3-ditia-2,4-difosfetano 2,4-disolfuro
LC MS, LCMS, LC-MS o LC/MS	cromatografia liquida spettroscopia di massa
LG	Gruppo uscente (ad esempio, alogeno, mesilato, triflato)
LHMDS o LiHMDS	esametildisilazide di litio
m/z	massa divisa per carica
Me	Metile
MeCN	Acetonitrile
MeOH	Metanolo

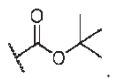


Met	Specie metalliche per accoppiamento incrociato (ad esempio, MgX, ZnX, SnR ₃ , SiR ₃ , B(OR) ₂)
mg	Milligrammi
min	Minuti
mL	Millilitri
MS	spettri di massa
NaHMDS	esametildisilazide di sodio
NBS	N-bromosuccinimide
<i>n</i> -BuLi	<i>n</i> -butillitio
NCS	N-clorosuccinimide
NMR	risonanza magnetica nucleare
Pd ₂ (dba) ₃	tris(dibenzilidenacetone)dipalladio(0)
Pd(dppf)Cl ₂ ·DCM	[1,1'-Bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(I), complesso con diclorometano
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(trifenilfosfina)palladio(0)
Ph	Fenile
PR o PG o gruppo Prot.	gruppo protettivo
rbf	pallone a fondo rotondo
RP-HPLC	cromatografia liquida ad alta pressione a fase inversa
TA o ta	temperatura ambiente
sat.	saturo

SFC	cromatografia a fluido supercritico
SPhos Pd G3 o SPhos G3	Metansolfonato di (2-dicicloesilfosfino-2',6'-dimetossibifenil)[2-(2'-ammino-1,1'-bifenil)]palladio(II)
TBAF	tetra- <i>n</i> -butilammonio fluoruro
TBTU	Tetrafluoroborato di <i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)uronio
<i>t</i> -BuOH	<i>t</i> -butanolo
TEA o Et ₃ N	Trimetilammina
TFA	acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
UV	Ultravioletti

[0005] L'uso dei termini "un/uno/una/un", "il/lo/la/l", e riferimenti simili nel contesto della descrizione dell'invenzione (specialmente nel contesto delle rivendicazioni) deve essere interpretato per coprire sia il singolare sia il plurale, salvo diversamente indicato. La recitazione di intervalli di valori ha qui semplicemente lo scopo di servire come metodo abbreviato per riferirsi individualmente a ciascun valore separato che rientra nell'intervallo, se non diversamente indicato nel presente documento, e ogni valore separato è incorporato nella descrizione specifica come se fosse qui recitato individualmente. L'uso di qualsiasi e tutti gli esempi o dei termini esemplificativi (ad esempio "come") qui forniti è destinato a chiarire meglio l'invenzione e, salvo altrimenti rivendicato, non pone limiti all'ambito di protezione

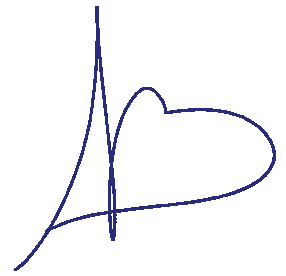
dell'invenzione. Nessun termine nella descrizione deve essere interpretato come se indicasse eventuali elementi non rivendicati come essenziali all'attuazione dell'invenzione.

[0006] Come usato nel presente documento, il termine Boc si riferisce alla struttura .

Composti della divulgazione

[0007] Nel presente documento sono forniti inibitori di KRAS aventi struttura di Formula I, discussi in maggiore dettaglio di seguito.

[0008] I composti divulgati nel presente documento includono tutti i composti etichettati con isotopi accettabili farmaceuticamente in cui uno o più atomi dei composti divulgati nel presente documento sono sostituiti da atomi aventi lo stesso numero atomico, ma una massa atomica o un numero di massa differente dalla massa atomica o dal numero di massa solitamente trovati in natura. Esempi di isotopi che possono essere incorporati nei composti divulgati includono isotopi di idrogeno, carbonio, azoto, ossigeno, fosforo, fluoro, cloro e iodio, come ^2H , ^3H , ^{11}C , ^{13}C , ^{14}C , ^{13}N , ^{15}N , ^{15}O , ^{17}O , ^{18}O , ^{31}P , ^{32}P , ^{35}S , ^{18}F , ^{36}Cl , ^{123}I , e ^{125}I , rispettivamente. Questi composti radioetichettati potrebbero essere utili per aiutare a determinare o misurare l'efficacia dei composti, caratterizzando, ad esempio, il sito o la modalità di azione o l'affinità di legame con il sito di azione farmacologicamente importante. Certi composti etichettati con isotopi della divulgazione, per esempio quelli che incorporano un isotopo radioattivo, sono utili in studi di distribuzione tessutale di farmaci e/o substrati. Gli isotopi radioattivi trizio, ossia ^3H , e



carbonio-14, ossia ^{14}C , sono particolarmente utili per questo scopo in considerazione della loro facilità di incorporazione e dei mezzi pronti di rilevamento.

[0009] La sostituzione con isotopi più pesanti, come il deuterio, vale a dire ^2H , può dare alcuni vantaggi terapeutici che derivano dalla maggiore stabilità metabolica, per esempio l'aumentata emivita in vivo o requisiti di dosaggio ridotti e, quindi, è preferita in alcune circostanze.

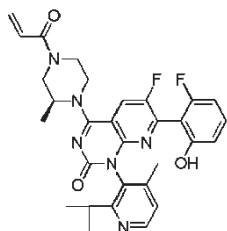
[0010] La sostituzione con isotopi emittenti positroni, come ^{11}C , ^{18}F , ^{15}O e ^{13}N , può essere utile in studi di Tomografia a Emissione di Positroni (PET) per esaminare l'occupazione di recettori di substrato. Composti etichettati con isotopi di struttura (I) possono generalmente essere preparati mediante tecniche convenzionali note ai tecnici del ramo o mediante processi analoghi a quelli descritti in Preparazioni ed Esempi come riportati sotto usando un appropriato reagente etichettato con isotopi al posto del reagente non etichettato precedentemente impiegato.

[0011] I composti etichettati con isotopi come divulgati qui possono essere preparati generalmente mediante tecniche convenzionali note ai tecnici del ramo oppure mediante processi analoghi a quelli descritti negli esempi e schemi allegati usando reagenti etichettati con isotopi appropriati al posto del reagente non etichettato precedentemente impiegato.

[0012] I composti divulgati nel presente documento includono tutte le forme tautomeriche dei composti.

[0013] Alcuni dei composti divulgati nel presente documento possono esistere come atropisomeri, che sono stereoisomeri conformazionali che si verificano quando la rotazione attorno a un singolo legame nella molecola viene impedita, o notevolmente rallentata, come risultato di interazioni steriche con altre parti della molecola. I composti divulgati nel presente documento includono tutti gli atropisomeri, sia come preparazioni di singoli atropisomeri puri, preparazioni arricchite di ciascuno, sia come una miscela aspecifica di ciascuno. Laddove la barriera rotazionale attorno al singolo legame sia abbastanza alta, e l'interconversione tra conformazioni sia abbastanza lenta, la separazione e l'isolamento delle specie isomeriche possono essere permessi.

[0014] La presente invenzione divulga composti aventi una struttura selezionata tra:



o un suo atropisomero, un suo sale farmaceuticamente accettabile, o un sale farmaceuticamente accettabile del suo atropisomero.

[0100] In un'altra forma di realizzazione, questi composti possono essere usati come intermedi nel processo di produzione di composti nella presente domanda.

[0101] In un'altra forma di realizzazione, questi composti

possono essere sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile.

[0102] In un'altra forma di realizzazione, questi composti possono essere in una formulazione farmaceutica comprendente uno qualsiasi o più dei composti e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

[0103] In un'altra forma di realizzazione, questi composti possono essere usati in un metodo *in vitro* per inibire KRAS G12C in una cellula, comprendente mettere a contatto la cellula con il composto di uno qualsiasi dei composti o la formulazione farmaceutica.

[0104] In un'altra forma di realizzazione, questi composti sono per uso nel trattamento di cancro in un soggetto comprendente la somministrazione al soggetto di una quantità terapeuticamente efficace di qualsiasi dei composti o delle composizioni.

[0105] In un'altra forma di realizzazione, il cancro è cancro del polmone, cancro del pancreas o cancro del colon-retto.

[0106] In alcune forme di realizzazione, il cancro è cancro del polmone.

[0107] In un'altra forma di realizzazione, il cancro è cancro pancreatico.

[0108] In un'altra forma di realizzazione, il cancro è cancro del colon-retto.

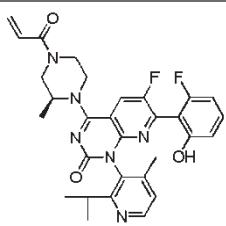
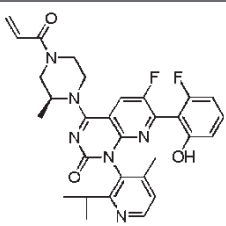
[0109] In un'altra forma di realizzazione, la presente invenzione comprende i composti per uso nel trattamento di cancro in un soggetto.

[0110] In un'altra forma di realizzazione, il cancro è una

neoplasia ematologica maligna.

[0111] Composti specificamente contemplati includono quelli elencati nella Tabella 1:

Tabella 1

Esempio n.	Struttura chimica	Esempio n.	Struttura chimica
1-1	 1° isomero eluente	1-2	 2° isomero eluente

Sintesi di composti divulgati

[0112] I composti come divulgati nel presente documento possono essere sintetizzati attraverso una serie di metodi specifici. Gli esempi che delineano vie sintetiche specifiche, e gli schemi generici di seguito sono intesi fornire una guida al chimico sintetico di competenza ordinaria, che apprezzerà prontamente che il solvente, la concentrazione, il reagente, il gruppo protettivo, l'ordine dei passaggi sintetici, il tempo, la temperatura e simili possono essere modificati secondo necessità, ben all'interno dell'abilità e del giudizio del tecnico di ordinaria competenza.

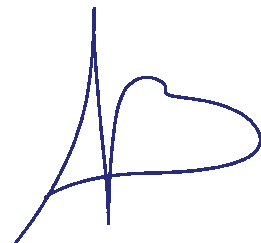
Composizioni farmaceutiche, dosaggio e vie di somministrazione

[0113] Nel presente documento sono altresì fornite composizioni farmaceutiche che includono un composto come divulgato

nel presente documento, insieme a un eccipiente farmaceuticamente accettabile, come, per esempio, un diluente o trasportatore. Composti e composizioni farmaceutiche adatti per l'uso nella presente invenzione includono quelli in cui il composto può essere somministrato in una quantità efficace per raggiungere il suo scopo previsto. Somministrazione del composto descritto in maggior dettaglio di seguito.

[0114] Formulazioni farmaceutiche adatte possono essere determinate dal tecnico del ramo a seconda della via di somministrazione e del dosaggio desiderato. Vedere per esempio, Remington's Pharmaceutical Sciences, 1435-712 (18esima ed., Mack Publishing Co, Easton, Pennsylvania, 1990). Formulazioni possono influenzare lo stato fisico, la stabilità, la velocità di rilascio in vivo e la velocità di eliminazione in vivo degli agenti somministrati. In funzione della via di somministrazione, una dose adatta può essere calcolata secondo il peso corporeo, l'area di superficie corporea o la dimensione degli organi. L'ulteriore affinamento dei calcoli necessari per determinare la dose di trattamento appropriata viene realizzato abitualmente dai tecnici del ramo di competenze di livello comune senza inutile sperimentazione, in particolare alla luce delle informazioni di dosaggio e dei saggi divulgati nella presente, nonché i dati farmacocinetici ottenibili attraverso sperimentazioni cliniche su animali o esseri umani.

[0115] Le frasi "farmaceuticamente accettabile" o "farmacologicamente accettabile" si riferiscono a entità molecolari e



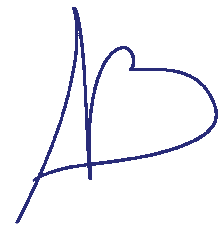
composizioni che non producono reazioni avverse, allergiche, o altre reazioni indesiderate quando somministrate a un animale o a un essere umano. Come usato nel presente documento, "trasportatore farmaceuticamente accettabile" include qualsiasi e tutti i solventi, mezzi di dispersione, rivestimenti, agenti antibatterici e antifungini, agenti isotonici e che ritardano l'assorbimento e simili. L'uso di tali eccipienti per sostanze farmaceuticamente attive è ben noto nell'arte. Ad eccezione nella misura in cui qualsiasi mezzo o agente convenzionale sia incompatibile con le composizioni terapeutiche, il suo uso nelle composizioni terapeutiche è contemplato. Anche principi attivi supplementari possono essere incorporati nelle composizioni. In forme di realizzazione esemplificative, la formulazione può comprendere solidi di sciroppo di mais, olio di cartamo altamente oleico, olio di cocco, olio di soia, L-leucina, fosfato di calcio tribasico, L-tirosina, L-prolina, L-lisina acetato, DATEM (un emulsionante), L-glutammina, L-valina, fosfato di potassio dibasico, L-iso-leucina, L-arginina, L-alanina, glicina, L-asparagina monoidrato, L-serina, citrato di potassio, L-treonina, citrato di sodio, cloruro di magnesio, L-istidina, L-metionina, acido ascorbico, carbonato di calcio, L-acido glutammico, L-cistina dicloridrato, L-triptofano, L-acido aspartico, cloruro di colina, taurina, m-inositolo, solfato ferroso, palmitato di ascorbile, solfato di zinco, L-carnitina, acetato di alfa-tocoferile, cloruro di sodio, niacinammide, tocoferoli misti, pantotenato di calcio, solfato cuprico, cloridrato di cloruro di tiamina, palmitato di vitamina A, solfato di manganese, riboflavina, cloridrato di

piridossina, acido folico, beta-carotene, ioduro di potassio, fillochinone, biotina, selenato di sodio, cloruro di cromo, molibdato di sodio, vitamina D3 e cianocobalamina.

[0116] Il composto può essere presente in una composizione farmaceutica come sale farmaceuticamente accettabile. Come usato nel presente documento, "sali farmaceuticamente accettabili" includono, per esempio sali di addizione di base e sali di addizione di acido.

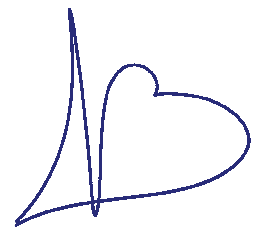
[0117] Sali di addizione di base farmaceuticamente accettabili possono essere formati con metalli o ammine, come metalli alcalini e alcalino-terrosi o ammine organiche. Sali farmaceuticamente accettabili di composti possono anche essere preparati con un catione farmaceuticamente accettabile. Cationi farmaceuticamente accettabili adatti sono ben noti ai tecnici del ramo e includono cationi alcalini, alcalino-terrosi, di ammonio, e ammonio quaternario. Sono anche possibili carbonati o idrogeno carbonati. Esempi di metalli usati come cationi sono sodio, potassio, magnesio, ammonio, calcio o ferrico, e simili. Esempi di ammine adatte includono isopropilammina, trimetilammina, istidina, N,N'-dibenziletildiammina, cloroprocaina, colina, dietanolammina, dicicloesilammina, etilendiammina, N-metilglucammina e procaina.

[0118] Sali di addizione di acido farmaceuticamente accettabili includono sali di acidi inorganici od organici. Esempi di sali di acidi adatti includono i cloridrati, formiati, acetati, citrati, salicilati, nitrati, fosfati. Altri sali farmaceuticamente accettabili adatti sono ben noti ai



tecniche del ramo e includono, per esempio, acido formico, acetico, citrico, ossalico, tartarico o mandelico, acido cloridrico, acido bromidrico, acido solforico o acido fosforico; con acidi organici carbossilici, solfonici, solforici o fosforici o acidi solfamminici N-sostituiti, per esempio acido acetico, acido trifluoroacetico (TFA), acido propionico, acido glicolico, acido succinico, acido maleico, acido idrossimaleico, acido metilmaleico, acido fumarico, acido malico, acido tartarico, acido lattico, acido ossalico, acido gluconico, acido glucarico, acido glucuronico, acido citrico, acido benzoico, acido cinnamico, acido mandelico, acido salicilico, acido 4-amminosalicilico, acido 2-fenossibenzoico, acido 2-acetossibenzoico, acido embonico, acido nicotinico o acido isonicotinico; e con amminoacidi, come i 20 amminoacidi alfa coinvolti nella sintesi di proteine in natura, per esempio acido glutammico o acido aspartico, e anche con acido fenilacetico, acido metansolfonico, acido etansolfonico, acido 2-idrossietansolfonico, acido etan 1,2-disolfonico, acido benzensolfonico, acido 4-metilbensolfonico, acido naftalen 2-solfonico, acido naftalen 1,5-disolfonico, acido 2- o 3-fosfoglicerato, glucosio 6 fosfato, acido N-cicloesilsolfammico (con la formazione di ciclamati), o con altri composti organici acidi, come acido ascorbico.

[0119] Le composizioni farmaceutiche contenenti i composti divulgati nel presente documento possono essere prodotte in un modo convenzionale, ad esempio, mediante processi di miscelazione, dissoluzione, granulazione, produzione di confetti, levigazione, emulsificazione, incapsulamento, intrappolamento o liofilizzazione



convenzionali. La formulazione corretta è dipendente dalla via di somministrazione scelta.

[0120] Per la somministrazione orale, composizioni adatte possono essere formulate facilmente combinando un composto divulgato nel presente documento con eccipienti farmaceuticamente accettabili come trasportatori ben noti nell'arte. Tali eccipienti e trasportatori consentono ai presenti composti di essere formulati come compresse, pillole, confetti, capsule, liquidi, gel, sciroppi, impasti, sospensioni e simili, per ingestione orale da parte di un paziente da trattare. Preparazioni farmaceutiche per l'uso orale possono essere ottenute aggiungendo un composto come divulgato nel presente documento un eccipiente solido, macinando facoltativamente una miscela risultante, e lavorando la miscela di granuli, dopo aver aggiunto ausiliari idonei, se desiderato, per ottenere compresse o nuclei di confetti. Eccipienti idonei includono, ad esempio, riempitivi e preparazioni di cellulosa. Se desiderato, possono essere aggiunti agenti disintegranti. Gli ingredienti farmaceuticamente accettabili sono ben noti per i vari tipi di formulazione e possono essere per esempio leganti (per esempio polimeri naturali o sintetici), lubrificanti, tensioattivi, agenti edulcoranti e aromatizzanti, materiali di rivestimento, conservanti, coloranti, addensanti, adiuvanti, agenti antimicrobici, antiossidanti e trasportatori per i vari tipi di formulazione.

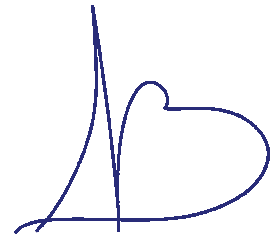
[0121] Quando una quantità terapeuticamente efficace di un composto divulgato nel presente documento viene somministrata per



via orale, la composizione è tipicamente sotto forma di un solido (ad esempio, compressa, capsula, pillola, polvere o pastiglia) o una formulazione liquida (ad esempio sospensione acquosa, soluzione, elisir o sciroppo).

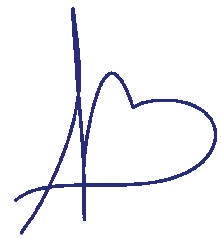
[0122] Quando somministrata in forma di compressa, la composizione può contenere in aggiunta un solido funzionale e/o trasportatore solido, come gelatina o adiuvante. La compressa, la capsula e la polvere possono contenere da circa l'1 a circa il 95% di composto, e preferibilmente da circa il 15 a circa il 90% di composto.

[0123] Quando somministrata in forma liquida o di sospensione, un liquido funzionale e/o un trasportatore liquido come acqua, petrolio od oli di origine animale o vegetale possono essere aggiunti. La forma liquida della composizione può, inoltre, contenere soluzione salina fisiologica, soluzioni di alcol zucchero, destrosio od altre soluzioni di saccaride o glicoli. Quando somministrata in forma liquida o in sospensione, la composizione può contenere da circa lo 0,5 a circa il 90% in peso di un composto divulgato nel presente documento, e preferibilmente da circa l'1 a circa il 50% di un composto divulgato nel presente documento. In una forma di realizzazione contemplata, il trasportatore liquido è non acquoso o sostanzialmente non acquoso. Per la somministrazione in forma liquida, la composizione può essere fornita come formulazione solida a rapida dissoluzione per la dissoluzione o la sospensione immediatamente prima della somministrazione.



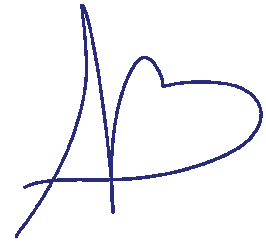
[0124] Quando una quantità terapeuticamente efficace di un composto divulgato nel presente documento viene somministrata mediante iniezione endovenosa, cutanea o sottocutanea, la composizione è sotto forma di una soluzione acquosa priva di pirogeni, parenteralmente accettabile. La preparazione di tali soluzioni parenteralmente accettabili, tenendo conto di pH, isotonicità, stabilità e simili, rientra nelle tecniche del ramo. Una composizione preferita per iniezione endovenosa, cutanea o sottocutanea contiene tipicamente, oltre a un composto divulgato nel presente documento, un veicolo isotonico. Tali composizioni possono essere preparate per la somministrazione come soluzioni di base libera o sali farmacologicamente accettabili in acqua opportunamente miscelati con un tensioattivo, come idrossipropilcellulosa. Le dispersioni possono anche essere preparate in glicerolo, glicoli polietilenici liquidi, e loro miscele e in oli. In condizioni ordinarie di conservazione e utilizzo, queste preparazioni possono contenere facoltativamente un conservante per prevenire la crescita di microorganismi.

[0125] Le composizioni iniettabili possono includere soluzioni, sospensioni o dispersioni acquose sterili e polveri sterili per la preparazione estemporanea di soluzioni, sospensioni o dispersioni iniettabili sterili. In tutte le forme di realizzazione, la forma deve essere sterile e deve essere fluida nella misura in cui esista una facile siringabilità. Deve essere stabile nelle condizioni di produzione e conservazione e deve resistere all'azione contaminante di



microrganismi, come batteri e funghi, mediante inclusione facoltativa di un conservante. Il trasportatore può essere un solvente o un mezzo di dispersione contenente, per esempio, acqua, etanolo, poliolo (per esempio, glicerolo, glicole propilenico, e glicole polietilenico liquido, e simili), loro miscele adatte e oli vegetali. In una forma di realizzazione contemplata, il trasportatore è non acquoso o sostanzialmente non acquoso. La corretta fluidità può essere mantenuta, per esempio, mediante l'uso di un rivestimento come lecitina, mediante il mantenimento della granulometria richiesta del composto nella forma di realizzazione di dispersione e mediante l'uso di tensioattivi. La prevenzione dell'azione di microrganismi può essere indotta mediante vari agenti antibatterici e antifungini, ad esempio parabeni, clorobutanolo, fenolo, acido sorbico, timerosal e simili. In molte forme di realizzazione sarà preferibile includere agenti isotonici, per esempio, zuccheri o cloruro di sodio. L'assorbimento prolungato delle composizioni iniettabili può essere indotto mediante l'uso nelle composizioni di agenti che ritardano l'assorbimento, ad esempio monostearato di alluminio e gelatina.

[0126] Soluzioni iniettabili sterili vengono preparate incorporando i composti attivi nella quantità necessaria nel solvente appropriato con svariati degli altri ingredienti elencati sopra, come necessario, a cui fa seguito sterilizzazione per filtrazione. In generale, le dispersioni vengono preparate incorporando i vari principi attivi sterilizzati in un veicolo sterile che contiene il mezzo di dispersione



basico e gli altri ingredienti necessari tra quelli elencati sopra. Nella forma di realizzazione di polveri sterili per la preparazione di soluzioni iniettabili sterili, i metodi preferiti di preparazione sono tecniche di essiccamento sottovuoto e liofilizzazione che danno una polvere del principio attivo più qualsiasi ingrediente desiderato aggiuntivo da una sua soluzione precedentemente sterilizzata per filtrazione.

[0127] Formulazioni a rilascio lento o a rilascio sostenuto possono anche essere preparate al fine di ottenere un rilascio controllato del composto attivo a contatto con i fluidi corporei nel tratto GI, e fornire un livello sostanzialmente costante ed efficace del composto attivo nel plasma sanguigno. Per esempio, il rilascio può essere controllato da uno o più tra dissoluzione, diffusione e scambio ionico. In aggiunta, l'approccio a lento rilascio può intensificare un assorbimento attraverso vie saturabili o limitanti all'interno del tratto GI. Per esempio, il composto può essere incorporato a questo scopo in una matrice polimerica di un polimero biodegradabile, un polimero idrosolubile o una miscela di entrambi e facoltativamente tensioattivi idonei. Incorporazione può significare in questo contesto l'incorporazione di microparticelle in una matrice di polimeri. Le formulazioni a rilascio controllato vengono ottenute anche attraverso l'incapsulamento di microparticelle disperse o microgoccioline emulsionate tramite tecnologie di rivestimento in dispersione o emulsione note.

[0128] Per la somministrazione mediante inalazione, i composti



della presente invenzione sono erogati in modo conveniente sotto forma di una presentazione spray per aerosol da confezioni pressurizzate o un nebulizzatore, con l'uso di un propellente adatto. Nella forma di realizzazione di un aerosol pressurizzato, l'unità di dosaggio può essere determinata fornendo una valvola per erogare una quantità misurata. Possono essere formulate capsule e cartucce, per esempio di gelatina per l'uso in un inalatore o insufflatore, contenenti una miscela in polvere del composto e una base in polvere idonea come lattosio o amido.

[0129] I composti divulgati nel presente documento possono essere formulati per la somministrazione parenterale mediante iniezione (ad esempio, mediante iniezione in bolo od infusione continua). Formulazioni per iniezione possono essere presentate in forma di dosaggio unitaria (ad esempio, in ampolle od in contenitori multi-dose) con un conservante aggiunto. Le composizioni possono assumere forme quali sospensioni, soluzioni o emulsioni in veicoli oleosi o acquosi e possono contenere agenti di formulazione, come agenti di sospensione, di stabilizzazione e/o di dispersione.

[0130] Formulazioni farmaceutiche per somministrazione parenterale includono soluzioni acquose dei composti in forma idrosolubile. Inoltre, le sospensioni dei composti possono essere preparate come sospensioni oleose per iniezione appropriate. Solventi o veicoli lipofili idonei includono oli grassi od esteri di acidi grassi sintetici. Sospensioni acquose per iniezione possono contenere



sostanze che aumentano la viscosità della sospensione. La sospensione può facoltativamente contenere anche stabilizzanti adatti od agenti che aumentano la solubilità dei composti e consentono la preparazione di soluzioni altamente concentrate. In alternativa, una presente composizione può essere sotto forma di polvere per la ricostituzione con un veicolo idoneo (ad esempio, acqua priva di pirogeni sterile) prima dell'uso.

[0131] Composti divulgati nel presente documento possono altresì essere formulati in composizioni rettali, come supposte o clisteri di ritenzione (ad esempio contenenti basi per supposte convenzionali). Oltre alle formulazioni descritte in precedenza, i composti possono essere altresì formulati come preparazione di deposito. Tali formulazioni ad azione prolungata possono essere somministrate mediante impianto (ad esempio, per via sottocutanea o intramuscolare) o mediante iniezione intramuscolare. Quindi, per esempio, i composti possono essere formulati con materiali polimerici o idrofobici adeguati (per esempio come emulsione in un olio accettabile) o resine a scambio ionico, o come derivati moderatamente solubili, per esempio come sale moderatamente solubile.

[0132] In particolare, un composto divulgato nel presente documento può essere somministrato per via orale, buccale, o sublinguale sotto forma di compresse contenenti eccipienti, come amido o lattosio, od in capsule od ovuli, da soli od in miscela con eccipienti, o sotto forma di elisir o sospensioni contenenti agenti

aromatizzanti o coloranti. Tali preparazioni liquide possono essere preparate con additivi farmaceuticamente accettabili, come agenti di sospensione. Un composto può anche essere iniettato per via parenterale, per esempio, per via endovenosa, intramuscolare, sottocutanea o intracoronarica. Per la somministrazione parenterale, il composto viene usato meglio sotto forma di una soluzione acquosa sterile che può contenere altre sostanze, ad esempio sali o alcoli di zucchero, come mannitolo o glucosio, per rendere la soluzione isotonica con il sangue.

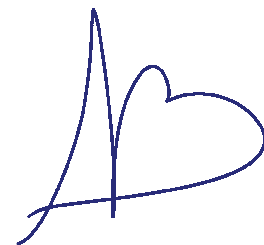
[0133] Per uso veterinario, un composto divulgato nel presente documento viene somministrato come formulazione idoneamente accettabile secondo la normale pratica veterinaria. Il veterinario può determinare facilmente il regime di dosaggio e la via di somministrazione che è più appropriata per un particolare animale.

[0134] In alcune forme di realizzazione, tutti i componenti necessari per il trattamento di un disturbo correlato a KRAS usando un composto come divulgato nel presente documento da solo o in combinazione con un altro agente o intervento tradizionalmente usato per il trattamento di tale malattia possono essere confezionati in un kit. Specificamente, la presente invenzione fornisce un kit per l'uso nell'intervento terapeutico della malattia comprendente una serie confezionata di medicinali che includono il composto divulgato nel presente documento nonché tamponi e altri componenti per preparare forme erogabili di detti medicinali, e/o dispositivi per erogare tali

medicinali, e/o qualsiasi agente che viene usato in terapia di combinazione con il composto divulgato nel presente documento, e/o istruzioni per il trattamento della malattia confezionata con i medicinali. Le istruzioni possono essere fissate in qualsiasi supporto tangibile, come carta stampata, o un supporto magnetico od ottico leggibile da computer, o istruzioni per fare riferimento a una fonte di dati di informatici remota come una pagina web accessibile tramite internet.

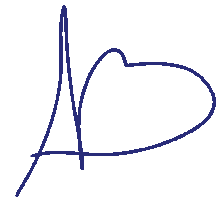
[0135] Una quantità terapeuticamente efficace indica una quantità efficace per trattare o prevenire lo sviluppo di o alleviare i sintomi esistenti del soggetto che viene trattato. La determinazione delle quantità terapeuticamente efficaci rientra nella capacità dei tecnici del ramo, specialmente alla luce della divulgazione dettagliata fornita nel presente documento. Generalmente, una "dose terapeuticamente efficace" si riferisce a quella quantità del composto che dà come risultato il raggiungimento dell'effetto desiderato. Per esempio, in una forma di realizzazione preferita, una quantità terapeuticamente efficace di un composto divulgato nel presente documento diminuisce l'attività di KRAS di almeno il 5%, rispetto al controllo, almeno il 10%, almeno il 15%, almeno il 20%, almeno il 25%, almeno il 30%, almeno il 35%, almeno il 40%, almeno il 45%, almeno il 50%, almeno il 55%, almeno il 60%, almeno il 65%, almeno il 70%, almeno il 75%, almeno l'80%, almeno l'85% o almeno il 90%.

[0136] La quantità di composto somministrata può essere dipendente dal soggetto che viene trattato, dall'età, dalla salute, dal



Sesso e dal peso del soggetto, dal tipo di trattamento concomitante (se presente), dalla gravità dell'afflizione, dalla natura dell'effetto desiderato, dalla modalità e dalla frequenza di trattamento, e dal giudizio del medico prescrivente. La frequenza di dosaggio può anche essere dipendente da effetti farmacodinamici su pressioni di ossigeno arterioso. Tuttavia, il dosaggio massimamente preferito può essere adattato al singolo soggetto, come è compreso e determinabile da un tecnico del ramo, senza indebita sperimentazione. Questo comporta tipicamente la regolazione di una dose standard (ad esempio, riduzione della dose se il paziente ha un basso peso corporeo).

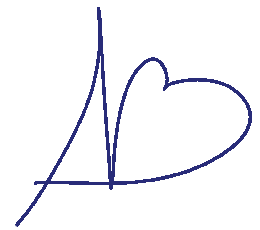
[0137] Mentre le esigenze individuali variano, la determinazione di intervalli ottimali di quantità efficaci del componente è all'interno dell'abilità del ramo. Per la somministrazione a un essere umano nel trattamento curativo o profilattico delle condizioni e dei disturbi identificati nel presente documento, per esempio, i dosaggi tipici dei composti della presente invenzione possono essere da circa 0,05 mg/kg/giorno a circa 50 mg/kg/giorno, per esempio almeno 0,05 mg/kg, almeno 0,08 mg/kg, almeno 0,1 mg/kg, almeno 0,2 mg/kg, almeno 0,3 mg/kg, almeno 0,4 mg/kg, o almeno 0,5 mg/kg, e preferibilmente 50 mg/kg o meno, 40 mg/kg o meno, 30 mg/kg o meno, 20 mg/kg o meno, o 10 mg/kg o meno, che può essere da circa 2,5 mg/giorno (0,5 mg/kg x 5 kg) a circa 5.000 mg/giorno (50 mg/kg x 100 kg), per esempio. Per esempio, i dosaggi dei composti possono essere da circa 0,1 mg/kg/giorno a circa 50 mg/kg/giorno, da circa 0,05 mg/kg/giorno a



circa 10 mg/kg/giorno, da circa 0,05 mg/kg/giorno a circa 5 mg/kg/giorno, da circa 0,05 mg/kg/giorno a circa 3 mg/kg/giorno, da circa 0,07 mg/kg/giorno a circa 3 mg/kg/giorno, da circa 0,09 mg/kg/giorno a circa 3 mg/kg/giorno, da circa 0,05 mg/kg/giorno a circa 0,1 mg/kg/giorno, da circa 0,1 mg/kg/giorno a circa 1 mg/kg/giorno, da circa 1 mg/kg/giorno a circa 10 mg/kg/giorno, da circa 1 mg/kg/giorno a circa 5 mg/kg/giorno, da circa 1 mg/kg/giorno a circa 3 mg/kg/giorno, da circa 3 mg/giorno a circa 500 mg/giorno, da circa 5 mg/giorno a circa 250 mg/giorno, da circa 10 mg/giorno a circa 100 mg/giorno, da circa 3 mg/giorno a circa 10 mg/giorno o da circa 100 mg/giorno a circa 250 mg/giorno. Tali dosi possono essere somministrate in una singola dose o possono essere divise in dosi multiple.

Metodi per usare inibitori di KRAS G12C

[0138] La presente divulgazione fornisce un metodo per inibire la trasmissione del segnale cellulare mediata da RAS comprendente mettere a contatto una cellula con una quantità efficace di uno o più composti divulgati nel presente documento. L'inibizione della trasduzione del segnale mediata da RAS può essere valutata e dimostrata mediante un'ampia varietà di modi noti nell'arte. Esempi non limitativi includono una dimostrazione di (a) una diminuzione dell'attività di GTPasi di RAS; (b) una diminuzione dell'affinità di legame a GTP o un aumento dell'affinità di legame a GDP; (c) un aumento di Koff di GTP o una diminuzione di Koff di GDP; (d) una diminuzione dei livelli di molecole di trasduzione di trasmissione del segnale a valle nella via di

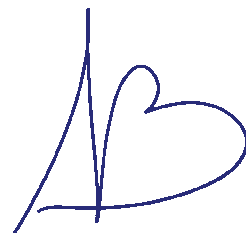


RAS, come una diminuzione dei livelli di pMEK, pERK o pAKT; e/o (e) una diminuzione del legame del complesso di RAS a molecole di trasmissione del segnale a valle incluse ma non limitate a Raf. Kit e saggi disponibili in commercio possono essere utilizzati per determinare uno o più di quanto sopra.

[0139] La divulgazione fornisce anche composti o composizioni farmaceutiche della presente divulgazione per uso nel trattamento di condizioni di malattia, incluse ma non limitate a condizioni implicate da mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS (ad esempio, cancro).

[0140] In alcune forme di realizzazione, una quantità efficace di qualsiasi delle precedenti composizioni farmaceutiche comprendenti un composto come divulgato nel presente documento per uso nel trattamento di cancro a un soggetto che ne ha necessità. In alcune forme di realizzazione, il cancro è mediato da una mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS. In varie forme di realizzazione, il cancro è cancro pancreatico, cancro del colon-retto o cancro polmonare. In alcune forme di realizzazione, il cancro è cancro della cistifellea, cancro della tiroide e cancro del dotto biliare.

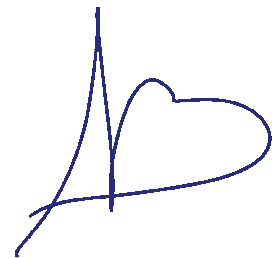
[0141] In alcune forme di realizzazione la divulgazione fornisce composti per l'uso nel trattamento di un disturbo in un soggetto che ne ha necessità, in cui il detto trattamento comprende determinare se il soggetto ha una mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS e se il soggetto viene determinato avere la mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS, e somministrare poi al soggetto una dose



terapeuticamente efficace di almeno un composto come divulgato nel presente documento o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

[0142] I composti divulgati inibiscono la crescita cellulare indipendente dall'ancoraggio e pertanto hanno il potenziale di inibire una metastasi tumorale. Di conseguenza, in un'altra forma di realizzazione i composti divulgati sono forniti per l'uso nel trattamento dell'inibizione di metastasi tumorale, comprendendo la somministrazione di una quantità efficace di un composto divulgato nel presente documento.

[0143] Mutazioni di G12C di KRAS, HRAS o NRAS sono state identificate anche in neoplasie ematologiche maligne (ad esempio, cancro che colpiscono sangue, midollo osseo e/o linfonodi). Di conseguenza, determinate forme di realizzazione sono dirette ai composti divulgati (ad esempio, sotto forma di una composizione farmaceutica) per l'uso nel trattamento di una neoplasia ematologica maligna. Tali neoplasie maligne includono, ma non sono limitate a, leucemie e linfomi. Per esempio, i composti divulgati nel presente documento possono essere usati per il trattamento di malattie come leucemia linfoblastica acuta (ALL), leucemia mieloide acuta (AML), leucemia linfocitica cronica (CLL), linfoma linfocitico piccolo (SLL), leucemia mielogena cronica (CML), leucemia monocitica acuta (AMoL) e/o altre leucemie. In altre forme di realizzazione, i composti sono utili per il trattamento di linfomi come tutti i sottotipi di linfoma di Hodgkins o linfoma non Hodgkins. In varie forme di realizzazione, i composti sono



per l'uso nel trattamento di neoplasie maligne di cellule plasmatiche come mieloma multiplo, linfoma di cellula del mantello e macroglubunemia di Waldenstrom.

[0144] La determinazione se un tumore o cancro comprende una mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS può essere intrapresa valutando la sequenza nucleotidica codificante per la proteina di KRAS, HRAS o NRAS, valutando la sequenza amminoacidica della proteina di KRAS, HRAS o NRAS, o valutando le caratteristiche di una putativa proteina mutante di KRAS, HRAS o NRAS. La sequenza di KRAS, HRAS o NRAS di uomo di tipo selvatico è nota nell'arte (ad esempio accesso n. NP203524).

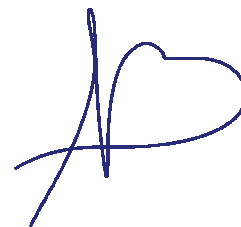
[0145] Metodi per rilevare una mutazione in una sequenza nucleotidica di KRAS, HRAS o NRAS sono noti ai tecnici del ramo. Questi metodi includono, ma non sono limitati a, saggi di reazione a catena della polimerasi-polimorfismo di lunghezza di frammento di restrizione (PCR-RFLP), saggi di reazione a catena della polimerasi-polimorfismo conformazionale a singolo filamento (PCR-SSCP), saggi di PCR in tempo reale, sequenziamento di PCR, saggi di amplificazione per PCR specifica per allele mutante (MASA), sequenziamento diretto, reazioni di estensione di primer, elettroforesi, saggi di ligazione oligonucleotidica, saggi di ibridazione, saggi TaqMan, saggi di genotipizzazione di SNP, saggi di fusione ad alta risoluzione e analisi di microarray. In alcune forme di realizzazione, i campioni sono valutati per mutazioni di G12C di KRAS, HRAS o NRAS mediante PCR in



tempo reale. Nella PCR in tempo reale, vengono usate sonde fluorescenti specifiche per la mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS. Quando è presente una mutazione, la sonda si lega e viene rilevata fluorescenza. In alcune forme di realizzazione, la mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS è identificata usando un metodo di sequenziamento diretto di regioni specifiche (ad esempio esone 2 e/o esone 3) nel gene di KRAS, HRAS o NRAS. Questa tecnica identificherà tutte le possibili mutazioni nella regione sequenziata.

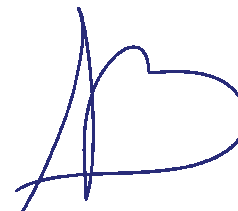
[0146] Metodi per rilevare una mutazione in una proteina di KRAS, HRAS o NRAS sono noti ai tecnici del ramo. Questi metodi includono, ma non sono limitati a, rilevamento di un mutante di KRAS, HRAS o NRAS usando un agente di legame (ad esempio, un anticorpo) specifico per la proteina mutante, elettroforesi proteica e Western blot, e sequenziamento peptidico diretto.

[0147] Metodi per determinare se un tumore o cancro comprende una mutazione di G12C di KRAS, HRAS o NRAS possono usare una varietà di campioni. In alcune forme di realizzazione, il campione è prelevato da un soggetto avente un tumore o cancro. In alcune forme di realizzazione, il campione è un campione di tumore/cancro fresco. In alcune forme di realizzazione, il campione è un campione di tumore/cancro congelato. In alcune forme di realizzazione, il campione è un campione incorporato in paraffina fissato con formalina. In alcune forme di realizzazione, il campione è un campione di cellule tumorali circolanti (CTC). In alcune forme di realizzazione, il campione




viene processato in un lisato cellulare. In alcune forme di realizzazione, il campione viene processato in DNA o RNA.

[0148] La divulgazione riguarda anche i composti divulgati per l'uso nel trattamento di un disturbo iperproliferativo in un mammifero che comprende la somministrazione a detto mammifero di una quantità terapeuticamente efficace di un composto come divulgato nel presente documento, o di un suo sale farmaceuticamente accettabile. In alcune forme di realizzazione, detto uso si riferisce al trattamento di un soggetto che soffre di un cancro come leucemia mieloide acuta, cancro in adolescenti, carcinoma adrenocorticale in infanzia, cancri correlati all'AIDS (ad esempio linfoma e sarcoma di Kaposi), cancro anale, cancro dell'appendice, astrocitomi, teratoide atipico, carcinoma a cellule basali, cancro del dotto biliare, cancro della vescica, cancro osseo, glioma dello stelo cerebrale, tumore della mammella, tumori bronchiali, linfoma di Burkitt, tumore carcinoide, teratoide atipico, tumori embrionali, tumore a cellule germinali, linfoma primario, cancro della cervice, cancri infantili, cordoma, tumori cardiaci, leucemia linfocitica cronica (CLL), leucemia mielogena cronica (CML), disturbi mieloproliferativi cronici, cancro del colon, cancro del colon-retto, craniofaringioma, linfoma a cellule T cutaneo, carcinoma duttale extraepatico in situ (DCIS), tumori embrionali, cancro del SNC, cancro endometriale, ependimoma, cancro esofageo, estesioneuroblastoma, sarcoma di Ewing, tumore a cellule germinali extracraniche, tumore a cellule germinali extragonadali, cancro agli occhi, istiocitoma fibroso dell'osso, cancro alla cistifellea,



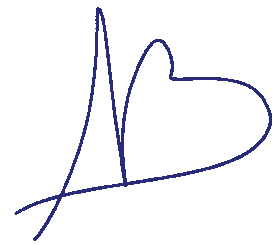
cancro gastrico, tumore carcinoide gastrointestinale, tumori stromali gastrointestinali (GIST), tumore a cellule germinali, tumore trofoblastico gestazionale, leucemia a cellule capellute, cancro della testa e del collo, cancro del cuore, cancro del fegato, linfoma di Hodgkin, cancro ipofaringeo, melanoma intraoculare, tumore a cellule insulari, tumori neuroendocrini creatici, cancro del rene, cancro laringeo, cancro del labbro e della cavità orale, cancro del fegato, carcinoma lobulare in situ (LCIS), cancro del polmone, linfoma, cancro del collo squamoso metastatico con primario occulto, carcinoma del tratto mediano, cancro della bocca, sindromi di neoplasia endocrina multipla, mieloma multiplo/neoplasia a plasmacellula, micosi fungoidi, sindromi mielodisplastiche, neoplasie mielodisplastiche/mieloproliferative, mieloma multiplo, carcinoma a cellule di merkel, mesotelioma maligno, istiocitoma fibroso maligno dell'osso e osteosarcoma, cancro della cavità nasale e del seno paranasale, cancro nasofaringeo, neuroblastoma, linfoma non Hodgkin, cancro polmonare non a piccole cellule (NSCLC), cancro orale, cancro del labbro e della cavità orale, cancro orofaringeo, cancro ovarico, cancro del pancreas, papillomatosi, paraganglioma, cancro del seno paranasale e della cavità nasale, cancro delle paratiroidi, cancro del pene, ^[L]_[SEP] cancro della faringe, blastoma pleuropolmonare, linfoma primario del sistema nervoso centrale (SNC), cancro alla prostata, cancro del retto, cancro a cellule transizionali, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cancro delle ghiandole salivari, cancro della pelle, cancro dello stomaco (gastrico), cancro del



polmone a piccole cellule, cancro dell'intestino tenue, sarcoma dei tessuti molli, linfoma a cellule T, cancro ai testicoli, cancro alla gola, timoma e carcinoma timico, cancro tiroideo, cancro a cellule transizionali della pelvi renale e dell'uretere, tumore trofoblastico, cancro insoliti dell'infanzia, cancro dell'uretra, sarcoma uterino, cancro vaginale, cancro vulvare o cancro indotto da virus. In alcune forme di realizzazione detto trattamento si riferisce a un disturbo iperproliferativo non canceroso quale iperplasia benigna della pelle (per esempio, psoriasi), restenosi o della prostata (per esempio ipertrofia prostatica benigna (BPH)).

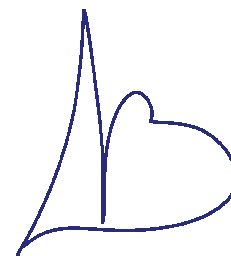
[0149] In alcune forme di realizzazione, il trattamento è diretto al trattamento di cancro polmonari, comprendente la somministrazione di una quantità efficace di qualsiasi dei composti sopra descritti (o di una composizione farmaceutica comprendente gli stessi) a un soggetto che ne ha necessità. In determinate forme di realizzazione il cancro del polmone è un carcinoma polmonare non a piccole cellule (NSCLC), per esempio adenocarcinoma, carcinoma polmonare a cellule squamose o carcinoma polmonare a grandi cellule. In alcune forme di realizzazione, il cancro del polmone è un carcinoma polmonare a piccole cellule. Altri cancro polmonari trattabili con i composti divulgati includono, ma non sono limitati a, tumori ghiandolari, tumori carcinoidi e carcinomi indifferenziati.

[0150] La divulgazione fornisce inoltre metodi per modulare un'attività di proteina di KRAS, HRAS o NRAS mutante G12C mettendo



a contatto la proteina con una quantità efficace di un composto della divulgazione. Modulazione può consistere in inibire o attivare l'attività di proteina. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi di inibizione di attività proteica mettendo a contatto la proteina di KRAS, HRAS o NRAS mutante G12C con una quantità efficace di un composto della divulgazione in soluzione. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività della proteina di KRAS, HRAS o NRAS mutante G12C mettendo a contatto una cellula, tessuto od organo che esprime la proteina di interesse. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività proteica in un soggetto inclusi, ma non limitati a, roditori e mammiferi (ad esempio, esseri umani) somministrando nel soggetto una quantità efficace di un composto della divulgazione. In alcune forme di realizzazione, la modulazione percentuale supera il 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%. In alcune forme di realizzazione, la percentuale di inibizione supera il 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, o 90%.

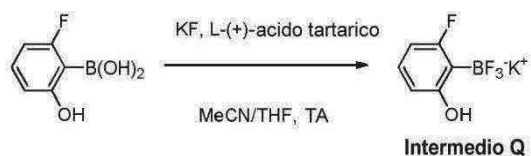
[0151] In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in una cellula mettendo a contatto detta cellula con una quantità di un composto della divulgazione sufficiente a inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in detta cellula. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in un tessuto mettendo a contatto detto tessuto con una quantità di un



composto della divulgazione sufficiente a inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in detto tessuto. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in un organismo mettendo a contatto detto organismo con una quantità di un composto della divulgazione sufficiente a inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in detto organismo. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in un animale mettendo a contatto detto animale con una quantità di un composto della divulgazione sufficiente a inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in detto animale. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in un mammifero mettendo a contatto detto mammifero con una quantità di un composto della divulgazione sufficiente a inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in detto mammifero. In alcune forme di realizzazione, la divulgazione fornisce metodi per inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in un essere umano mettendo a contatto detto essere umano con una quantità di un composto della divulgazione sufficiente a inibire l'attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in detto essere umano. La presente divulgazione fornisce metodi per trattare una malattia mediata da attività di KRAS, HRAS o NRAS G12C in un soggetto che ha necessità di tale trattamento.

Esempi

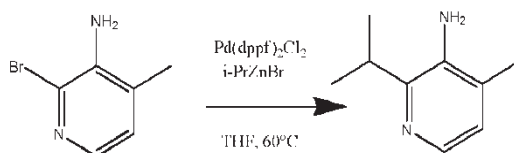
[0152] Preparazione degli intermedi Q e R:



[0153] Trifluoroborato di (2-fluoro-6-idrossifenil)potassio

(Intermedio Q). Una soluzione di fluoruro di potassio (44,7 g, 770 mmol) in acqua (75 mL) è stata aggiunta a una sospensione di acido (2-fluoro-6-idrossifenil)boronico (30 g, 192 mmol, Combi-Blocks, San Diego, CA, USA) in acetonitrile (750 mL). La miscela è stata agitata per 2 min e poi una soluzione di L-(+)-acido tartarico (72,2 g, 481 mmol) in THF (375 mL) è stata aggiunta per un periodo di 10 min tramite imbuto di addizione. La miscela è stata agitata vigorosamente con un agitatore meccanico per 1 ora, e poi la sospensione risultante è stata filtrata, e i solidi filtrati sono stati lavati con una piccola quantità di THF. I solidi sono stati scartati e il filtrato è stato parzialmente concentrato fino a quando i solidi hanno iniziato a precipitare fuori dalla soluzione. La miscela è stata poi raffreddata fino a -20 °C e agitata per 16 ore. La reazione è stata riscaldata lentamente ed è stato aggiunto 2-propanolo (20 mL). La sospensione risultante è stata filtrata e i solidi filtrati sono stati lavati con 2-propanolo. Il filtrato è stato nuovamente parzialmente concentrato fino a formare una sospensione e poi è stato raffreddato fino a -20 °C e agitato per altri 20 minuti. La sospensione risultante è stata diluita con 2-propanolo e filtrata, e i solidi filtrati sono stati lavati con 2-propanolo. I due lotti di solidi sono stati combinati per fornire 2-fluoro-6-idrossifenil)trifluoroborato di potassio (**Intermedio Q**). ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 8,07 (q, *J* = 14,7 Hz, 1 H) 6,93 (q, *J* = 7,5

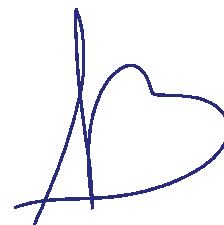
Hz, 1 H) 6,30-6,38 (m, 2 H).



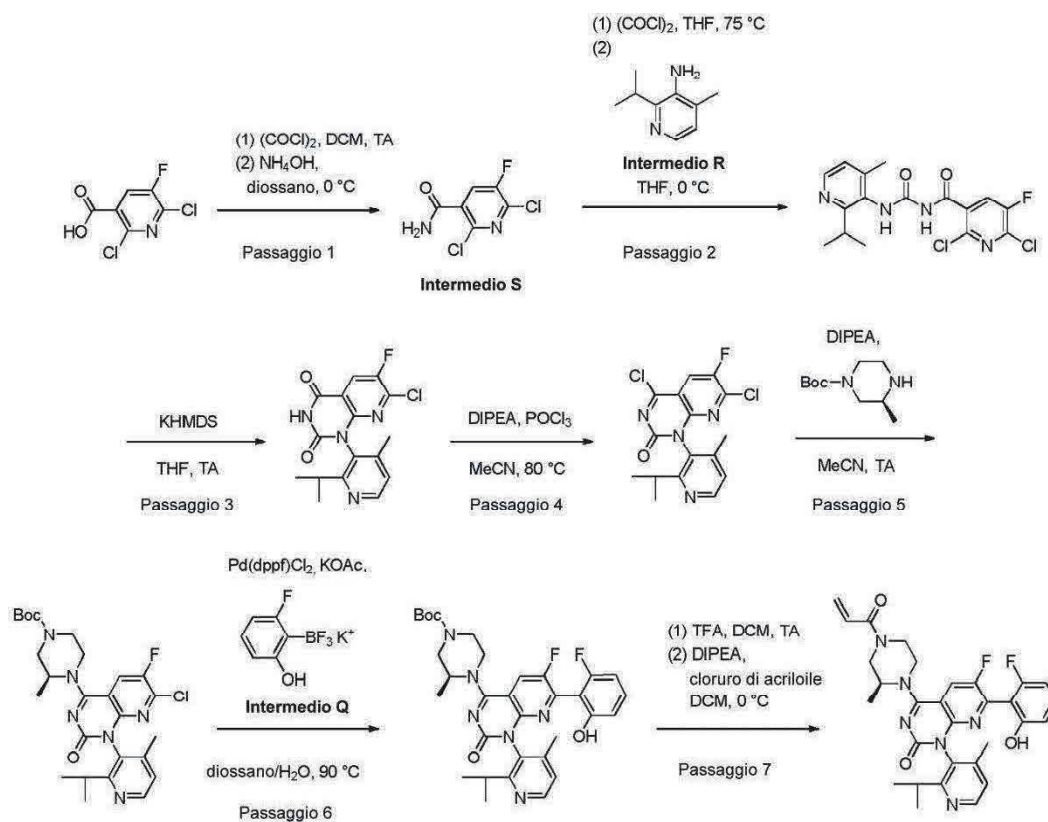
2-isopropil-4-metilpiridin-3-ammina (Intermedio R). A uno impasto di 3-ammino-2-bromo-4-picolina (360 mg, 1,9 mmol, Combi-Blocks, San Diego, CA, USA) in THF (4 mL) è stato aggiunto [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II), complesso con diclorometano (79 mg, 0,10 mmol). L'impasto risultante è stato deossigenato con argon per 2 min e poi è stato aggiunto bromuro di 2-propilzinco (soluzione 0,5 M in THF, 5,40 mL, 2,7 mmol, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). La soluzione risultante è stata riscaldata a 60 °C per 17 ore, poi il riscaldamento è stato arrestato e la reazione è stata lasciata raffreddare fino a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata spenta con acqua (10 mL) e soluzione di NaOH 1 N (20 mL) e poi è stata estratta con EtOAc (2x). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (eluente: MeOH allo 0-15%/DCM) per fornire 2-isopropil-4-metilpiridin-3-ammina. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 7,66 (d, *J*=4,6 Hz, 1 H), 6,78 (d, *J*=4,8 Hz, 1 H), 4,72 (br s, 2 H), 3,14-3,25 (m, 1 H), 2,08 (s, 3 H), 1,14 (d, *J*= 6,8 Hz, 6 H). *m/z* (ESI, ione +ve): 151,1 (M+H)⁺.

Esempio 1

6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-



d]pirimidin-2(1H)-one



[0154] Passaggio 1: 2,6-Dicloro-5-fluoronicotinammide

(Intermedio S). A una miscela di acido 2,6-dicloro-5-fluoro-nicotinico (4,0 g, 19,1 mmol, AstaTech Inc., Bristol, PA) in diclorometano (48 mL) è stato aggiunto cloruro di ossalile (soluzione 2 M in DCM, 11,9 mL, 23,8 mmol), seguito da una quantità catalitica di DMF (0,05 mL). La reazione è stata agitata a temperatura ambiente per una notte e poi è stata concentrata. Il residuo è stato disciolto in 1,4-diossano (48 mL) e raffreddato a 0 °C. Una soluzione di idrossido di ammonio (base di NH_3 al 28,0-30%, 3,6 mL, 28,6 mmol) è stata aggiunta lentamente tramite siringa. La miscela risultante è stata agitata a 0 °C per 30 min e poi è stata concentrata. Il residuo è stato diluito con una miscela 1:1 di

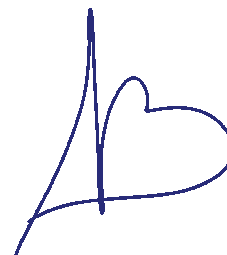
EtOAc/eptano e agitato per 5 min, poi è stato filtrato. I solidi filtrati sono stati scartati, e l'acqua madre rimanente è stata parzialmente concentrata a metà del volume e filtrata. I solidi filtrati sono stati lavati con eptano ed essiccati in un forno a pressione ridotta (45 °C) per una notte per fornire 2,6-dicloro-5-fluoronicotinammide. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ ppm 8,23 (d, $J=7,9$ Hz, 1 H) 8,09 (br s, 1 H) 7,93 (br s, 1 H). m/z (ESI, ione +ve): 210,9 (M+H) $^+$.

[0155] Passaggio 2: 2,6-Dicloro-5-fluoro-N-((2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)carbamoil)nicotinammide. A un impasto ghiacciato di 2,6-dicloro-5-fluoronicotinammide (**Intermedio S**, 5,0 g, 23,9 mmol) in THF (20 mL) è stato aggiunto lentamente cloruro di ossalile (soluzione 2 M in DCM, 14,4 mL, 28,8 mmol) tramite siringa. La miscela risultante è stata riscaldata a 75 °C per 1 ora, poi il riscaldamento è stato interrotto, e la reazione è stata concentrata a metà del volume. Dopo raffreddamento a 0 °C, è stato aggiunto THF (20 mL), seguito da una soluzione di 2-isopropil-4-metilpiridin-3-ammina (**Intermedio R**, 3,59 g, 23,92 mmol) in THF (10 mL), goccia a goccia tramite cannula. La miscela risultante è stata agitata a 0 °C per 1 ora e poi è stata spenta con una miscela 1:1 di salamoia e cloruro di ammonio acquoso saturo. La miscela è stata estratta con EtOAc (3x) e gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati per fornire 2,6-dicloro-5-fluoro-N-((2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)carbamoil)nicotinammide. Questo materiale è stato usato senza ulteriore purificazione nel passaggio successivo. m/z (ESI, ione +ve):

385,1(M+H)⁺.

[0156] Passaggio 3: 7-cloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1H,3H)-dione. A una soluzione raffreddata con ghiaccio di 2,6-dicloro-5-fluoro-*N*-((2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)carbamoil)nicotinammide (9,2 g, 24,0 mmol) in THF (40 mL) è stato aggiunto KHMDS (soluzione 1 M in THF, 50,2 mL, 50,2 mmol) lentamente tramite siringa. Il bagno di ghiaccio è stato rimosso e la miscela risultante è stata agitata per 40 minuti a temperatura ambiente. La reazione è stata spenta con cloruro di ammonio acquoso saturo ed estratta con EtOAc (3x). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (eluente: 0-50% di 3:1 EtOAc-EtOH/eptano) per fornire 7-cloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1H,3H)-dione. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 12,27 (br s, 1H), 8,48-8,55 (m, 2 H), 7,29 (d, *J*= 4,8 Hz, 1 H), 2,87 (quin, *J*= 6,6 Hz, 1 H), 1,99-2,06 (m, 3 H), 1,09 (d, *J*=6,6 Hz, 3 H), 1,01 (d, *J*=6,6 Hz, 3 H). ¹⁹F NMR (376 MHz, DMSO-*d*₆) δ: -126,90 (s, 1 F). *m/z* (ESI, ione +ve): 349,1 (M+H)⁺.

[0157] Passaggio 4: 4,7-Dicloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)pirido[2,3-*d*]pirimidin-2(1H)-one. A una soluzione di 7-cloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)pirido[2,3-*d*]pirimidin-2,4(1H,3H)-dione (4,7 g, 13,5 mmol) e DIPEA (3,5 mL, 20,2 mmol) in acetonitrile (20 mL) è stato aggiunto ossicloruro di fosforo (1,63 mL, 17,5 mmol) a gocce tramite siringa. La miscela risultante è stata



riscaldata a 80 °C per 1 ora, e poi è stata raffreddata fino a temperatura ambiente e concentrata per fornire 4,7-dicloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)pirido[2,3-*d*]pirimidin-2(1H)-one. Questo materiale è stato usato senza ulteriore purificazione nel passaggio successivo. *m/z* (ESI, ione +ve): 367,1 (M+H)⁺.

[0158] Passaggio 5: 4-(7-cloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)-2-osso-1,2-diidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-3-metilpiperazin-1-carbossilato di (S)-*t*-butile. A una soluzione ghiacciata di 4,7-dicloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)pirido[2,3-*d*]pirimidin-2(1H)-one (13,5 mmol) in acetonitrile (20 mL) è stato aggiunto DIPEA (7,1 mL, 40,3 mmol), seguito da (S)-4-*N*-Boc-2-metil piperazina (3,23 g, 16,1 mmol, Combi-Blocks, Inc., San Diego, CA, USA). La miscela risultante è stata riscaldata a temperatura ambiente e agitata per 1 ora, poi è stata diluita con soluzione acquosa satura fredda di bicarbonato di sodio (200 mL) ed EtOAc (300 mL). La miscela è stata agitata per altri 5 min, gli strati sono stati separati, e lo strato acquoso è stato estratto con altro EtOAc (1x). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (eluente: 0-50% di EtOAc/eptano) per fornire 4-(7-cloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)-2-osso-1,2-diidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-3-metilpiperazin-1-carbossilato di (S)-*t*-butile. *m/z* (ESI, ioni +ve): 531,2 (M+H)⁺.

[0159] Passaggio 6: 4-(6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-

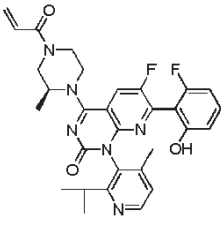
(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)-2-osso-1,2-diidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-3-metilpiperazin-1-carbossilato di (3*S*)-*t*-butile. Una miscela di 4-(7-cloro-6-fluoro-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)-2-osso-1,2-diidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-3-metilpiperazin-1-carbossilato di (*S*)-*t*-butile (4,3 g, 8,1 mmol), trifluoro(2-fluoro-6-idrossifenil)borato di potassio (**Intermedio Q**, 2,9 10,5 mmol), acetato di potassio (3,2 g, 32,4 mmol) e [1,1'-bis(difenilfosfino)ferrocene]dicloropalladio(II), complesso con diclorometano (661 mg, 0,81 mmol) in 1,4-diossano (80 mL) è stato degassato con azoto per 1 min. È stata aggiunta acqua deossigenata (14 mL), e la miscela risultante è stata riscaldata a 90 °C per 1 ora. La reazione è stata lasciata raffreddare fino a temperatura ambiente, spenta con bicarbonato di sodio acquoso semi-saturo, ed estratta con EtOAc (2x) e DCM (1x). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (eluente: 0-60% di 3:1 EtOAc-EtOH/eptano) per fornire 4-(6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)-2-osso-1,2-diidropirido[2,3-*d*]pirimidin-4-il)-3-metilpiperazin-1-carbossilato di (3*S*)-*t*-butile. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ ppm 10,19 (br s, 1 H), 8,38 (d, *J*= 5,0 Hz, 1 H), 8,26 (dd, *J*= 12,5, 9,2 Hz, 1 H), 7,23-7,28 (m, 1 H), 7,18 (d, *J*= 5,0 Hz, 1 H), 6,72 (d, *J*= 8,0 Hz, 1 H), 6,68 (t, *J*=8,9 Hz, 1 H), 4,77-4,98 (m, 1 H), 4,24 (br t, *J*=14,2 Hz, 1 H), 3,93-4,08 (m, 1 H), 3,84 (br d, *J*=12,9 Hz, 1 H), 3,52-3,75 (m, 1 H), 3,07-3,28 (m, 1 H), 2,62-2,74 (m, 1 H), 1,86-1,93 (m, 3 H), 1,43-1,48 (m, 9 H), 1,35 (dd, *J*= 10,8, 6,8 Hz, 3 H), 1,26-1,32 (m, 1 H),

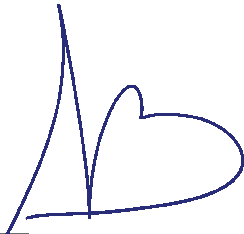
1,07 (dd, $J = 6,6, 1,7$ Hz, 3 H), 0,93 (dd, $J = 6,6, 2,1$ Hz, 3 H). ^{19}F NMR (376 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ : -115,65 (s, 1 F), -128,62 (s, 1 F). m/z (ESI, ione +ve): 607,3 (M+H) $^+$.

[0160] Passaggio 7: 6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3- d]pirimidin-2(1H)-one. Acido trifluoroacetico (25 mL, 324 mmol) è stato aggiunto a una soluzione di 4-(6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(2-isopropil-4-metilpiridin-3-il)-2-osso-1,2-diidropirido[2,3- d]pirimidin-4-il)-3-metilpiperazin-1-carbossilato di (3S)-*t*-butile (6,3 g, 10,4 mmol) in DCM (30 mL). La miscela risultante è stata agitata a temperatura ambiente per 1 ora e poi è stata concentrata. Il residuo è stato disciolto in DCM (30 mL), raffreddato a 0 °C, e trattato in sequenza con DIPEA (7,3 mL, 41,7 mmol) e una soluzione di cloruro di acriliole (0,849 mL, 10,4 mmol) in DCM (3 mL; aggiunta goccia a goccia tramite siringa). La reazione è stata agitata a 0 °C per 10 min, poi è stata spenta con bicarbonato di sodio acquoso semi-saturo ed estratta con DCM (2x). Gli strati organici combinati sono stati essiccati su solfato di sodio anidro e concentrati. Il residuo è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (eluente: 0-100% di 3:1 EtOAc-EtOH/eptano) per fornire 6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3- d]pirimidin-2(1H)-one. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ ppm 10,20 (s, 1 H), 8,39 (d, $J = 4,8$ Hz, 1 H), 8,24-8,34 (m, 1 H), 7,23-7,32 (m, 1 H), 7,19 (d, $J = 5,0$ Hz, 1 H), 6,87 (td, $J = 16,3, 11,0$ Hz,

1 H), 6,74 (d, $J=8,6$ Hz, 1 H), 6,69 (t, $J=8,6$ Hz, 1 H), 6,21 (br d, $J = 16,2$ Hz, 1 H), 5,74-5,80 (m, 1 H), 4,91 (br s, 1 H), 4,23-4,45 (m, 2 H), 3,97-4,21 (m, 1 H), 3,44-3,79 (m, 2 H), 3,11-3,31 (m, 1 H), 2,67-2,77 (m, 1 H), 1,91 (s, 3 H), 1,35 (d, $J= 6,8$ Hz, 3 H), 1,08 (d, $J = 6,6$ Hz, 3 H), 0,94 (d, $J=6,8$ Hz, 3 H). ^{19}F NMR (376 MHz, DMSO- d_6) δ ppm -115,64 (s, 1 F), -128,63 (s, 1 F). m/z (ESI, ione +ve): 561,2 (M+H) $^+$.

[0161] Tabella 2: Esempi di composti separati includenti stereoisomeri, alcuni dei quali sono atropisomeri

Esempio n.	Struttura chimica	Nome	SM racemico / condizioni di separazione
1-1	 1° isomero eluente	6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido [2,3-d]pirimidin-2(1H)-one	1/ SFC (Chiralpak IC, 30 x 250 mm, 5 μm , 55% di MeOH/CO $_2$, 120 g/min, 10,3 MPa (103 bar)).



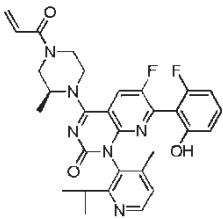
1-2	 <p>2° isomero eluente</p>	6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido [2,3-d]pirimidin-2(1H)-one	1/ SFC (Chiralpak IC, 30 x 250 mm, 5 µm, 55% di MeOH/CO ₂ , 120 g/min, 10,3 MPa (103 bar)).
-----	---	---	---

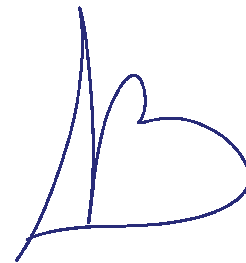
Tabella 3: Dati analitici per singoli esempi

1-1	561,2	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 10,20 (s, 1 H), 8,39 (d, <i>J</i> = 4,8 Hz, 1 H), 8,24-8,34 (m, 1 H), 7,23-7,32 (m, 1 H), 7,19 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1 H), 6,87 (td, <i>J</i> = 16,3, 11,0 Hz, 1 H), 6,74 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1 H), 6,69 (t, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1 H), 6,21 (br d, <i>J</i> = 16,2 Hz, 1 H), 5,74-5,80 (m, 1 H), 4,91 (br s, 1 H), 4,23-4,45 (m, 2 H), 3,97-4,21 (m, 1 H), 3,44-3,79 (m, 2 H), 3,11-3,31 (m, 1 H), 2,67-2,77 (m, 1 H), 1,91 (s, 3 H), 1,35 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3 H), 1,08 (d, <i>J</i> = 6,6 Hz, 3 H), 0,94 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3 H).
-----	-------	---

1-2	561,2	¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ ppm 10,20 (s, 1 H), 8,39 (d, <i>J</i> = 4,8 Hz, 1 H), 8,24-8,34 (m, 1 H), 7,23-7,32 (m, 1 H), 7,19 (d, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1 H), 6,87 (td, <i>J</i> = 16,3, 11,0 Hz, 1 H), 6,74 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1 H), 6,69 (t, <i>J</i> = 8,6 Hz, 1 H), 6,21 (br d, <i>J</i> = 16,2 Hz, 1 H), 5,74-5,80 (m, 1 H), 4,91-4,99 (br s, 1 H), 4,23-4,45 (m, 2 H), 3,97-4,21 (m, 1 H), 3,44-3,79 (m, 2 H), 3,11-3,31 (m, 1 H), 2,67-2,77 (m, 1 H), 1,91 (s, 3 H), 1,35 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3 H), 1,08 (d, <i>J</i> = 6,6 Hz, 3 H), 0,94 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3 H).
-----	-------	--

Dati di saggio biologico

[0162] Saggio di scambio nucleotidico accoppiato: La proteina di KRAS legata a GDP purificata (aa 1-169), contenente entrambe le sostituzioni amminoacidiche G12C e C118A e un tag His *N*-terminale, è stata pre-incubata con una titolazione di risposta a dose del composto per 5 min in tampone di saggio (HEPES 25 mM pH 7,4, MgCl₂ 10 mM, e Triton X-100 allo 0,01%). Dopo la preincubazione del composto, proteina SOS purificata (aa 564-1049) e GTP (Roche 10106399001) sono stati aggiunti ai pozzetti di saggio e incubati per altri 30 min. Per determinare l'entità dell'inibizione dello scambio nucleotidico mediato da SOS, cRAF con tag GST purificato (aa 1-149), biglie accettore di AlphaLISA chelato di nichel (PerkinElmer AL108R), e biglie donatrici di AlphaScreen glutatione (PerkinElmer 6765302) sono state aggiunte ai pozzetti di saggio e incubate per 5 minuti. Le piastre di saggio sono state quindi lette su un lettore Multietichetta EnVision



PerkinElmer, usando la tecnologia AlphaScreen®, e i dati sono stati analizzati usando un modello logistico a 4 parametri per calcolare i valori di IC₅₀.

[0163] Saggio di fosfo-ERK1/2 MSD: Cellule MIA PaCa-2 (ATCC® CRL-1420™) e A549 (ATCC® CCL-185™) sono state coltivate in terreno RPMI 1640 (ThermoFisher Scientific 11875093) contenente il 10% di siero fetale bovino (ThermoFisher Scientific 16000044) e 1x penicillina-streptomicina-glutammina (ThermoFisher Scientific 10378016). Sedici ore prima del trattamento con il composto, cellule MIA PaCa-2 o A549 sono state seminate in piastre di coltura cellulare a 96 pozzetti a una densità di 25.000 cellule/pozzetto e incubate a 37 °C, CO₂ al 5%. Una titolazione di risposta a dose del composto è stata diluita in terreni di crescita, aggiunta a pozzetti appropriati di una piastra di coltura cellulare, e poi incubata a 37 °C, CO₂ al 5% per 2 ore. Dopo il trattamento con il composto, le cellule sono state stimulate con 10 ng/mL di EGF (Roche 11376454001) per 10 min, lavate con soluzione salina tamponata con fosfato di Dulbecco ghiacciata, senza Ca²⁺ o Mg²⁺ (ThermoFisher Scientific 14190144), e poi lisate in tampone RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, Igepal all'1%, deossicolato di sodio allo 0,5%, NaCl 150 mM e dodecil solfato di sodio allo 0,5%) contenente inibitori di proteasi (Roche 4693132001) e inibitori di fosfatasi (Roche 4906837001). La fosforilazione di ERK1/2 in lisati trattati con composto è stata saggiata usando kit di lisato a cellule intere fosfo-ERK1/2 (Meso Scale Discovery K151DWD) secondo il

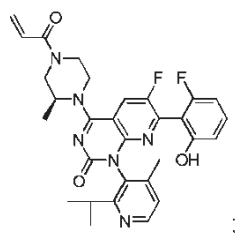
protocollo del produttore. Le piastre di saggio sono state lette su un Meso Scale Discovery Sector Imager 6000, e i dati sono stati analizzati usando un modello logistico a 4 parametri per calcolare i valori di IC₅₀.

[0164] Tabella 4: Attività biochimica e cellulare dei composti

Esempio n.	IC₅₀ di scambio accoppiato (µM)	IC₅₀ di p-ERK (MIA PaCa-2, µM)	IC₅₀ di p-ERK (A549, µM)
1	0,136	0,085	-
1-1	0,093	0,072	-
1-2	1,39	1,66	-

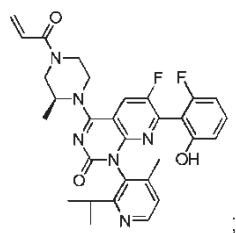
RIVENDICAZIONI

1. 6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1H)-one avente la seguente struttura chimica



o un suo atropisomero, un suo sale farmaceuticamente accettabile, o un sale farmaceuticamente accettabile del suo atropisomero.

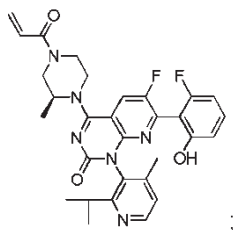
2. 6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1 H)-one, secondo la rivendicazione 1, avente la seguente struttura chimica



o un suo atropisomero, o un sale farmaceuticamente accettabile del suo atropisomero.

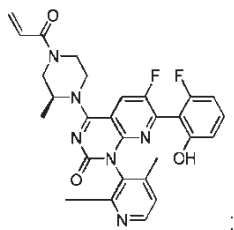
3. Atropisomero 1 di 6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1 H)-one, secondo la rivendicazione 2,

avente la seguente struttura chimica



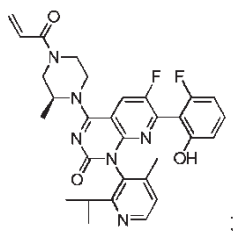
corrispondente al 1° isomero eluente ottenibile separando gli atropisomeri con cromatografia a fluido supercritico applicando Chiralpak IC, 30x250 mm, 5 µm, 55% di MeOH/CO₂, 120 g/min, 10,3 MPa (103 bar), o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

4. Atropisomero 1 di 6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1H)-one, secondo la rivendicazione 2, avente la seguente struttura chimica



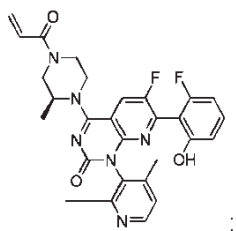
corrispondente al 1° isomero eluente ottenibile separando gli atropisomeri con cromatografia a fluido supercritico applicando Chiralpak IC, 30x250 mm, 5 µm, 55% di MeOH/CO₂, 120 g/min, 10,3 MPa (103 bar).

5. Atropisomero 2 di 6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1H)-one, secondo la rivendicazione 2, avente la seguente struttura chimica



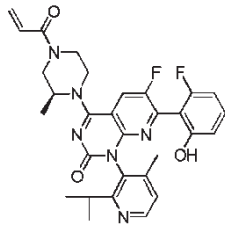
corrispondente al 2° isomero eluente ottenibile separando gli atropisomeri con cromatografia a fluido supercritico applicando Chiralpak IC, 30x250 mm, 5 μ m, 55% di MeOH/CO₂, 120 g/min, 10,3 MPa (103 bar), o un suo sale farmaceuticamente accettabile.

6. Atropisomero 2 di 6-fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1H)-one, secondo la rivendicazione 2, avente la seguente struttura chimica



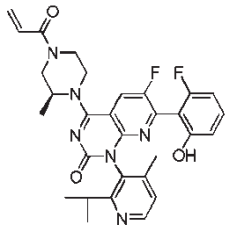
corrispondente al 2° isomero eluente ottenibile separando gli atropisomeri con cromatografia a fluido supercritico applicando Chiralpak IC, 30x250 mm, 5 μ m, 55% di MeOH/CO₂, 120 g/min, 10,3 MPa (103 bar).

7. 6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1H)-one, secondo la rivendicazione 1, avente la seguente struttura chimica



o suo sale farmaceuticamente accettabile.

8. 6-Fluoro-7-(2-fluoro-6-idrossifenil)-1-(4-metil-2-(2-propanil)-3-piridinil)-4-((2S)-2-metil-4-(2-propenoil)-1-piperazinil)pirido[2,3-d]pirimidin-2(1H)-one, secondo la rivendicazione 1, avente la seguente struttura chimica



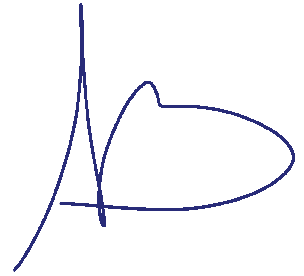
9. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 3, 5 e 7 sotto forma di un sale farmaceuticamente accettabile.

10. Formulazione farmaceutica comprendente uno qualsiasi o più dei composti delle rivendicazioni da 1 a 9 e un eccipiente farmaceuticamente accettabile.

11. Metodo in vitro per inibire KRAS G12C in una cellula, comprendente mettere a contatto la cellula con il composto di una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8 o la formulazione della rivendicazione 10.

12. Composto secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 9 per uso come medicinale.

13. Composto per uso secondo la rivendicazione 12, nel



trattamento di cancro.

14. Composto per uso secondo la rivendicazione 13, in cui il cancro è una neoplasia ematologica maligna, cancro del polmone, cancro pancreatico, cancro endometriale, cancro dell'appendice, cancro della pelle, melanoma intraoculare o cancro del colon-retto.

15. Composto per uso secondo la rivendicazione 14, in cui il cancro è un cancro polmonare non a piccole cellule.

16. Composto per uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 13 a 15, in cui il cancro è un cancro mutato in KRAS G12C.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.