



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102015000086600
Data Deposito	22/12/2015
Data Pubblicazione	22/06/2017

Classifiche IPC

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
C	07	H	19	06

Sezione	Classe	Sottoclasse	Gruppo	Sottogruppo
A	61	K	31	7056

Titolo

CARBAMMATI LIPIDICI DI FARMACI ANTITUMORALI

10835M Descrizione del brevetto per invenzione industriale avente per titolo:

EM/mc **“CARBAMMATI LIPIDICI DI FARMACI ANTITUMORALI”**

a nome : **1. CERUTI MAURIZIO (80%)**

2. RACCA SILVIA ANNA (10%)

3. ABBADESSA GIULIANA (10%)

residente in: 1. e 2. Torino;

3. Piossasco (Torino)

* * *

Generalità e stato dell'arte

Questa invenzione si riferisce a una nuova classe di carbammati lipofili di farmaci antitumorali come la Gemcitabina e la Citarabina.

Per aumentarne la stabilità metabolica, nel corso delle ultime decadi, sono state sviluppate varie classi di prodrugs di farmaci antitumorali, antivirali e antifungini, prendendo spesso spunto da precedenti studi sui gruppi protettivi in chimica organica [1]. Tra i carbammati sono da menzionare i derivati della N⁴-alcossicarbonilarabinofuranosilcitosina descritti in EP 0 0044085 A1 [2]. Essi contengono un gruppo alcossicarbonilico legato all'N⁴ della citosina, avente una catena alifatica da 4 a 22 atomi di carbonio. Essi, come anche i brevetti successivi di riferimento, sono stati ottenuti mediante reazione dell'arabinofuranosilcitosina con l'idoneo alogenuro alcossicarbonilico in presenza di una base organica come piridina, trietilammina, trimetilammina o di una base inorganica come sodio carbonato, sodio bicarbonato, potassio bicarbonato. Molti derivati dell'arabinofuranosilcitosina sono stati proposti principalmente come antitumorali per uso orale. EP 0 602 454 A1 [3] riguarda la sintesi e lo studio come antitumorali per uso orale e parenterale di precursori

del 5-fluorouracile e precisamente di derivati della 5'-deossi-5-fluorocitidina N-ossicarbonili sostituiti con catene da 3 a 7 atomi di carbonio. Tra questi, il composto leader è risultato il derivato pentilossi, che è entrato successivamente in clinica, con la denominazione di Capecitabina. Analogamente al brevetto precedente, la sintesi è stata ottenuta tra la 5'-deossi-5-fluorocitidina, dopo avere preventivamente protetto gli ossidrili dell'anello zuccherino con l'opportuno cloroformiato, in presenza di una base organica, con la successiva deprotezione dell'anello zuccherino. Sono stati sviluppati successivamente vari altri brevetti e pubblicazioni sulla Capecitabina che utilizzano diversi intermedi di sintesi. In tutti, il passaggio della formazione del gruppo carbammato, è stato condotto in modo analogo, ad esempio mediante reazione dell'ammino gruppo dell'anello fluorocitosinico con 4-n-pentilcloroformiato in diclorometano e piridina come base [4-7]. WO2010/063080 A1 descrive derivati N⁴-alchenilossicarbonilici e N⁴-alchilossicarbonilici della 5'-deossi-5-fluorocitidina, in cui le catene alcheniliche o alchiliche hanno solitamente 16 o 18 atomi di carbonio [8].

Recentemente è stata pubblicata una review sui metodi di sintesi dei carbammati, la loro stabilità chimica e metabolica, con un particolare approfondimento sui farmaci e sui composti con potenziale attività farmacologica, che posseggono nella struttura una funzione carbammato [9]. I metodi di sintesi dei carbammati sono stati spesso sviluppati per un loro utilizzo come gruppi protettivi in chimica organica [10-21].

Considerando le prodrugs ammidiche ed esteree, sono state sviluppate prodrugs tra la Gemcitabina o la Citarabina e acidi grassi a lunga catena, dei quali il derivato tra la Citarabina e l'acido elaidico è risultato il derivato più

promettente. Il brevetto WO 98/32762 [22] riguarda esteri e ammidici della Gemcitabina, in cui i gruppi in 3' o 5' e il gruppo N⁴ amminico sono stati derivatizzati con un gruppo acilico saturo o monoinsaturo con catene solitamente a 18 o 20 atomi di carbonio, preferibilmente un gruppo acilico selezionato tra oleoile, elaidoile, cis-eicoiseinoile e trans-eicoiseinoile. Sono stati sviluppati in seguito vari derivati analoghi nucleosidici esterei o ammidici, legando catene di acidi grassi di diversa lunghezza e diverso numero di doppi legami alla posizione 5' dell'anello zuccherino dell'ARA-C [23]. Sono stati studiati undici nuovi derivati, per trattare linee cellulari che possedevano resistenza all'ARA-C o alla Gemcitabina. E' stato osservato che i composti insaturi con catene aciliche più corte possedevano i più bassi valori di IC₅₀ [24,25]. La tecnologia dei vettori lipidici (LVT) è stata brevettata e applicata per sintetizzare innumerevoli derivati e tra questi la Elacitarabina è risultato il derivato più promettente [26,27]. Essa è il 5'-estere dell'ARA-C con l'acido elaidico e ha raggiunto la fase clinica [28]. L'Elacitarabina ha ricevuto nel 2007 dalla commissione europea lo stato di farmaco orfano, nel 2008 dalla US Food and Drug Administration e nel dicembre 2010, l'FDA le ha conferito la designazione "Fast Track". Sono stati sviluppati vari studi preclinici e clinici sull'Elacitarabina in monoterapia e in regimi in combinazione su tumori solidi ed ematologici [29-31]. L'Elacitarabina (CP-4055) e il coniugato 5'-estere della Gemcitabina con l'acido elaidico (CP-4126) hanno mostrato un miglioramento dell'attività verso cellule di linfomi resistenti ai farmaci parenti [32].

Nel 2004, alcuni di noi hanno ottenuto prodrugs ammidiche della Gemcitabina con catene lineari di acidi grassi legati in posizione 4, aventi 5, 12 e 18 atomi di carbonio e ne hanno valutato la stabilità in tamponi, nel plasma e

verso gli enzimi lisosomiali catepsine, confermando l'elevata stabilità all'idrolisi del legame ammidico [33]. E' stata studiata l'interazione delle prodrugs ammidiche della Gemcitabina verso modelli di biomembrane tramite le tecniche di Calorimetria a Scansione Differenziale (DSC) e Langmuir Blodgett (LB) [34,35]. Queste sono delle tecniche ampiamente usate per studiare gli effetti delle biomolecole sul doppio strato lipidico di una membrana di tipo cellulare, in processi di cattura e rilascio tra vescicole lipidiche. I risultati hanno mostrato che la Gemcitabina (GEM) da sola non interagisce con i modelli di biomembrane usati, mentre i derivati della 4-[(*N*)-acil]gemcitabina hanno interagito con i modelli di biomembrana, in modo differente a seconda della lunghezza delle catene aciliche dei fosfolipidi nelle biomembrane modello e della lunghezza delle catene aciliche delle prodrugs.

Nel 2004, alcuni di noi, insieme al gruppo di ricerca del Prof. Couvreur dell'Università di Parigi Sud, hanno scoperto che il legame covalente di vari nucleosidi di farmaci idrofili, come la Gemcitabina, la 2',3'-dideossicitidina, la 2',3'-dideossiinosina, formano delle prodrugs ammidiche che si autoassemblano spontaneamente in mezzo acquoso come nanoparticelle stabili, aventi diametri compresi tra 100 e 200 nm [36,37]. La 4-[(*N*)-1,1',2-*tris-nor-squalenoil*]gemcitabina (Sq-GEM), somministrata per via endovenosa, ha mostrato la protezione del gruppo amminico dall'inattivazione da parte della citidina deaminasi e un miglioramento dell'indice terapeutico, con un contemporaneo aumento della tossicità verso le cellule tumorali [38]. Il vettore nanoassemblato ha mostrato una maggiore attività antitumorale rispetto alla Gemcitabina libera, anche per via orale, su ratti con leucemia indotta da cellule RNK-16 LGL [39]. Tuttavia, studi di tossicità ematica condotti sulla 4-[(*N*)-

squalenoil]gemcitabina hanno mostrato che la tossicità ematica è la tossicità dose-limitante, a differenza della Gemcitabina da sola [40].

La squalenilazione dei farmaci antitumorali e antivirali come derivati ammidici e carbammati è stata ottenuta partendo dall'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide. Questo intermedio è stato ottenuto a partire dallo squalene, secondo un metodo generale sviluppato da alcuni di noi molti anni fa, in quanto è il sintone per ottenere molti inibitori della ossidosqualene ciclasi e della squalene epossidasi [41-44]. Questo metodo è basato sulla reazione dello squalene con *N*-bromosuccinimide in tetraidrofurano acquoso, chiusura del 2,3-eossido con carbonato di potassio e successiva apertura con acido periodico in etere etilico. La reazione dello squalene con *N*-bromosuccinimide in ambiente acquoso è risultata regiospecifica, in quanto si sono formate solo la monobromidrina e la dibromidrina esterna. L'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide è stata ossidata a 1,1',2-*tris-nor*-squalene acido (Sq-acido), al fine di ottenere i derivati ammidici dello squalene [36,37]. L'1,1',2-*tris-nor*-squalene alcol (Sq-alcol) è stato utilizzato per sintetizzare i nuovi carbammati squalenici descritti in questo brevetto. Esso è stato ottenuto mediante riduzione dell'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide con NaBH₄ con un metodo sviluppato in precedenza [45-47].

Studi NMR e di meccanica molecolare sullo squalene e su derivati squalenici condotti da alcuni di noi [48,49] e nel 2015 sulla Sq-GEM [50] hanno mostrato la presenza in soluzione di strutture dinamicamente ripiegate. Sulla base di questi studi NMR e mediante calcoli molecolari, è stato proposto che in un solvente a bassa polarità, lo squalene e vari suoi derivati esistono principalmente in una struttura estesa, mentre quando lo squalene e derivati si

trovano in solventi polari, le conformazioni ripiegate diventano prevalenti rispetto a quelle estese, perché risulta favorita la formazione di interazioni intramolecolari lipofile. Il ripiegamento massimizza le interazioni intramolecolari lipofile e minimizza il contatto con il solvente che è meno lipofilo dello squalene.

La Sq-GEM è stata sintetizzata mediante reazione in Et₃N e DMF tra la Gemcitabina e l'1,1',2-*tris-nor-squalene* acido, previamente attivato con etil cloroformiato [36,37]. Alcuni di noi hanno studiato la Sq-GEM nell'interazione con biomembrane, mediante la tecnica DSC [51]. Come modelli sintetici di biomembrane, sono stati utilizzati MLV liposomiali, composti di dimiristoilfosfatidilcolina (DMPC) che forniscono una chiara transizione di fase da una struttura ordinata di tipo gel a una struttura disordinata di tipo fluido. I risultati ottenuti hanno mostrato che la Gemcitabina e lo squalene da soli non interagiscono con il modello di biomembrana utilizzato. Al contrario, l'1,1',2-*tris-nor-squalene* acido e la Sq-GEM hanno interagito fortemente con il modello di biomembrana. E' stata anche studiata la Sq-GEM nell'interazione con il modello di biomembrana mediante la tecnica di Langmuir-Blodgett (LB) [51], confermando i precedenti risultati ottenuti mediante DSC.

In seguito, alcuni di noi hanno sintetizzato e formulato in forma nanoparticellare la 4-[1,1',2-*tris-nor-squalenoil*]-1 β -(arabinofuranosil)citosina o 4-[1,1',2-*tris-nor-squalenoil*]citarabina (Sq-ARA-C) [52]. E' stata studiata l'attività antitumorale su linee cellulari murine leucemiche (L1210, responsive all'ARA-C e L1210R resistenti), una linea cellulare umana leucemica (K562) e una linea cellulare di tumore mammario umano (MCF-7). La Sq-ARA-C ha mostrato una riduzione del valore di IC₅₀ di 2,5 volte per le cellule L1210R e

di 4 volte per le cellule K562 e MCF-7, rispetto all'ARA-C. Abbiamo anche studiato l'attività della Sq-ARA-C sul modello murino leucemico L1210R, ottenendo una marcata riduzione dello sviluppo del tumore.

In seguito sono stati sviluppati altri squalenoil derivati, come ad esempio quelli del Paclitaxel, legando direttamente una funzione esterea tra il Paclitaxel e lo squalene acido o intercalando vari spaziatori come l'acido succinico, l'acido glicolico o eteri del glicole polietilenico [40].

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1: Attività emolitica di ARA-C, Sq-ARA-C ammidi **10**, Sq-ARA-C carbammato **7** e Oleil-ARA-C carbammato **3** ottenuta esponendo eritrociti di donatori sani allo 0,1% dell'ematocrito ai diversi farmaci per 3 ore. I risultati, espressi come % del controllo positivo, sono riportati come media $\pm$ DS di tre esperimenti indipendenti.

* $p < 0,05$ vs ARA-C e Oleil-ARA-C carbammato a tutte le concentrazioni;
$p < 0,05$ vs Sq-ARA-C carbammato 5 μ M; § $p < 0,05$ vs ARA-C (tutte le concentrazioni) e Sq-ARA-C carbammato 5 μ M.

Figura 2: Attività emolitica di ARA-C, Sq-ARA-C ammidi **10** nanoparticelle (N) e Sq-ARA-C carbammato **7** nanoparticelle (N) ottenuta esponendo eritrociti di donatori sani allo 0,1% dell'ematocrito ai diversi farmaci per 3 ore. I risultati, espressi come % del controllo positivo, sono riportati come media $\pm$ DS di tre esperimenti indipendenti.

* $p < 0,05$ vs ARA-C e Sq-ARA-C carbammato a tutte le concentrazioni.

Figura 3: Attività emolitica di GEM, Sq-GEM ammidi **11** e Sq-GEM carbammato **8** ottenuta esponendo eritrociti di donatori sani allo 0,1% dell'ematocrito ai diversi farmaci per 3 ore. I risultati, espressi come

percentuale del controllo positivo, sono riportati come media $\pm$ DS di tre esperimenti indipendenti.

* $p < 0,05$ vs GEM a tutte le concentrazioni e Sq-GEM carbammato 1 e 4 μ M.

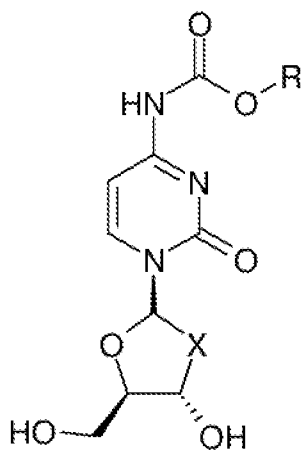
$p < 0,05$ vs GEM e Sq-GEM carbammato a tutte le concentrazioni, Sq-GEM amide 1, 4 e 8 μ M.

Figura 4: Attività emolitica di 1,1',2-*tris-nor*-squalene alcol (Sq-alcol) **5** e di 1,1',2-*tris-nor*-squalene acido (Sq-acido) **9** ottenuta esponendo eritrociti di donatori sani allo 0,1% dell'ematocrito ai due diversi composti per 3 ore. I risultati, espressi come percentuale del controllo positivo, sono riportati come media $\pm$ DS di tre esperimenti indipendenti.

* $p < 0,05$ vs Sq-alcool a tutte le concentrazioni; # $p < 0,05$ vs Sq-alcool (tutte le concentrazioni) e Sq-acido 1 μ M.

DESCRIZIONE DELL'INVENZIONE

Oggetto della presente invenzione sono carbammati lipofili di Gemcitabina (2',2'-difluoro-2'-deossicitidina) e di Citarabina (1- β -D-arabinofuranosilcitosina) rappresentati dalla formula (I)



(I)

in cui:

R è una catena alchenilica o alchilica, lineare o ramificata, avente da 6 a 32 atomi di carbonio e contenente da 1 a 6 doppi e/o tripli legami;

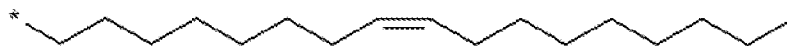
X è un radicale bivalente scelto tra CHOH o CF₂.

L'invenzione riguarda anche nanoparticelle ottenute da un composto di formula (I), nonché le composizioni farmaceutiche contenenti un composto di formula (I) o un composto di formula (I) in forma nanoparticellare.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

In una realizzazione dell'invenzione, nei composti di formula (I), R è una catena alchenilica avente da 10 a 32 atomi di carbonio contenente da 1 a 6 doppi legami e X è come sopra definito.

In un'altra realizzazione dell'invenzione, nei composti di formula (I), R è una catena alchenilica lineare avente da 14 a 20 atomi di carbonio e contenente 1, 2 o 3 doppi legami, più preferibilmente una catena alchenilica lineare avente da 16 a 18 atomi di carbonio e contenente 1 o 2 doppi legami, quale ad esempio un residuo *cis*-9-ottadecen-1-il, *trans*-9-ottadecen-1-il, *cis*-9-eicosen-1-il, *trans*-9-eicosen-1-il, *cis*-11-eicosen-1-il, *trans*-11-eicosen-1-il, *cis*-13-eicosen-1-il, *trans*-13-eicosen-1-il o *cis*-9,12-ottadecadien-1-il. In una realizzazione preferita dell'invenzione, R è un residuo *cis*-9-ottadecen-1-il di formula (A)



(A)

in cui l'asterisco * indica l'atomo di carbonio che si lega all'atomo di ossigeno del gruppo carbammato presente nei composti di formula (I).

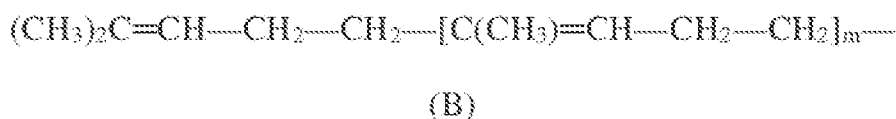
In un'altra realizzazione dell'invenzione, nei composti di formula (I), R

è rappresentato dal gruppo $R_1(CH_2)$, in cui R_1 è una catena alchenilica ramificata avente da 9 a 31 atomi di carbonio, contenente da 1 a 6 doppi legami e da 1 a 6 ramificazioni.

I doppi legami presenti in R_1 possono, indipendentemente tra di loro, essere in configurazione *cis* o *trans*. In alcune realizzazioni i doppi legami sono *trans*.

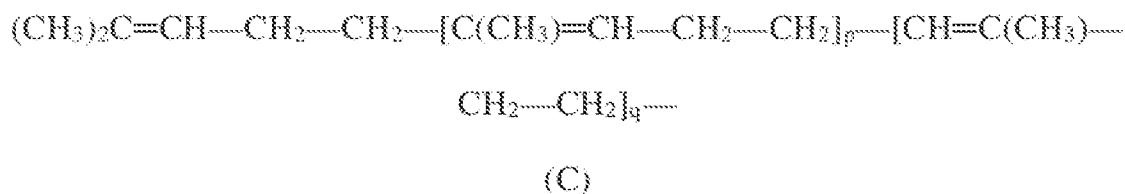
In alcune realizzazioni, le ramificazioni presenti in R_1 , sono preferibilmente dei gruppi metilici.

In alcune realizzazioni, R_1 è una catena alchenilica comprendente una o più unità isopreniche. Preferibilmente R_1 è scelto tra un residuo di formula (B):



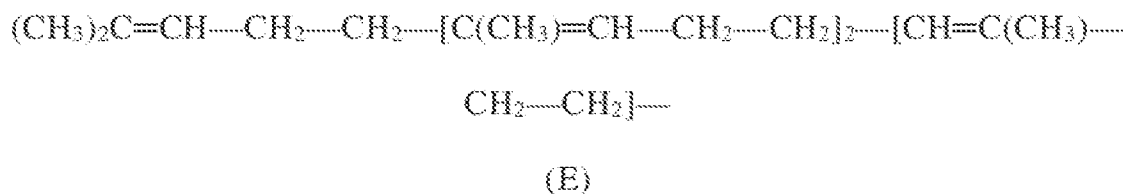
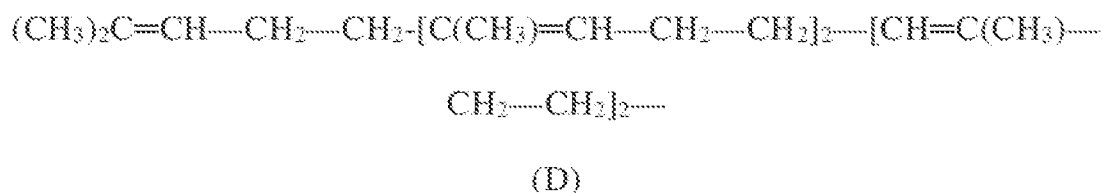
dove m è un numero intero compreso tra 1 e 5,

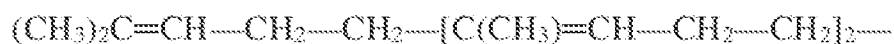
o un residuo di formula (C):



dove p è 1 o 2 e q è 0, 1 o 2.

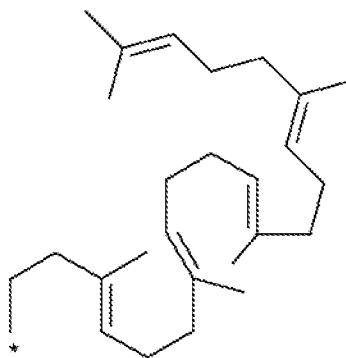
In alcune realizzazioni particolari, R_1 è un residuo di formula (D), (E), o (F):





(F)

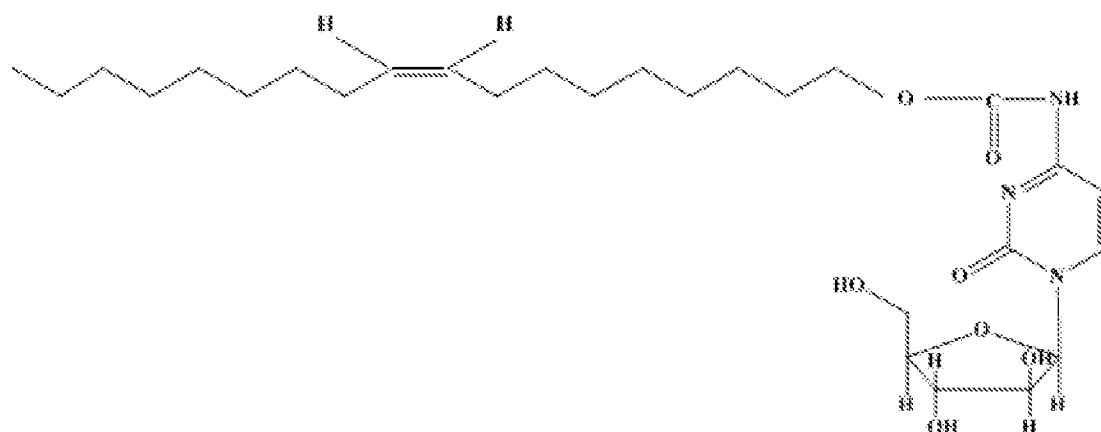
In una realizzazione preferita dell'invenzione R è il residuo 1,1',2-*tris-nor*-squalenile di formula (G):



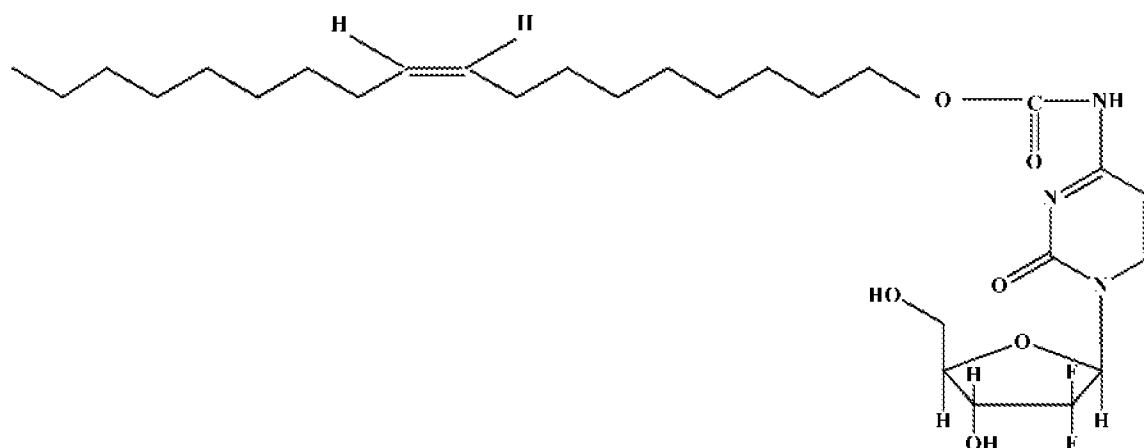
(G)

in cui l'asterisco * indica l'atomo di carbonio che si lega all'atomo di ossigeno del gruppo carbammato presente nei composti di formula (I).

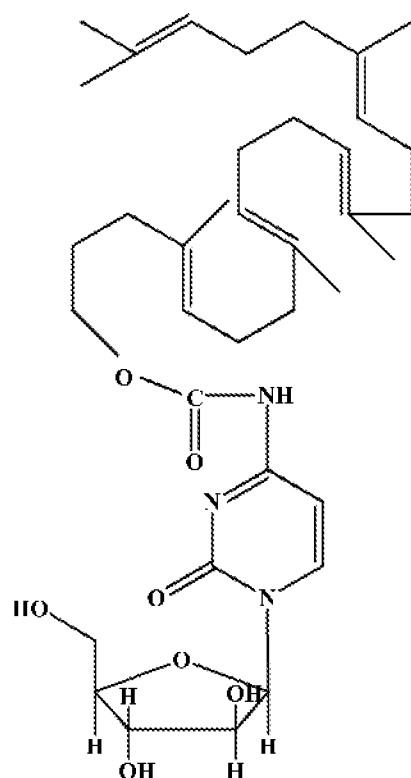
In una realizzazione dell'invenzione, R è un residuo *cis*-9-ottadecen-1-il di formula (A), X è CHOH ed il composto di formula (I) è 4-[(*N*)-oleilossicarbonil]-1β-(arabinofuranosil)citosina di formula



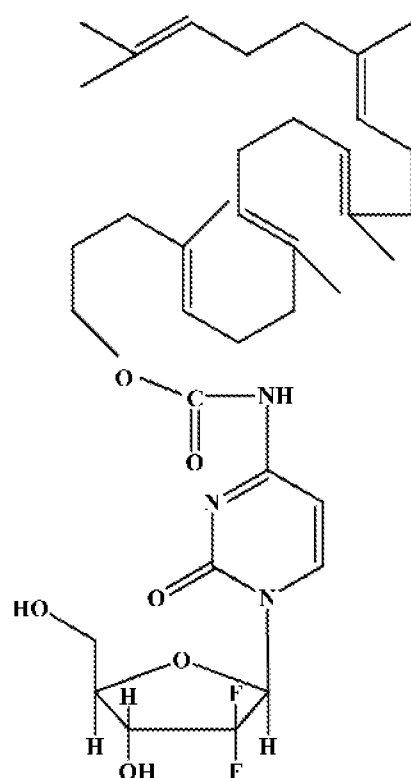
In un'altra realizzazione dell'invenzione, R è un residuo *cis*-9-ottadecen-1-il di formula (A), X è CF₂ ed il composto di formula (I) è 4-[(*N*)-oleilossicarbonil]gemcitabina di formula



In un'altra realizzazione dell'invenzione, R è il residuo 1,1',2-*tris-nor*-squalenile di formula (G), X è CHOH ed il composto di formula (I) è 4-[(N)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]-1 β -(arabinofuranosil)citosina di formula



In un'altra realizzazione dell'invenzione, R è il residuo 1,1',2-*tris-nor*-squalenile di formula (G), X è CF₂ ed il composto di formula (I) è 4-[(N)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]gemcitabina di formula



I composti dell'invenzione possono essere ottenuti mediante un procedimento che comprende i seguenti passaggi:

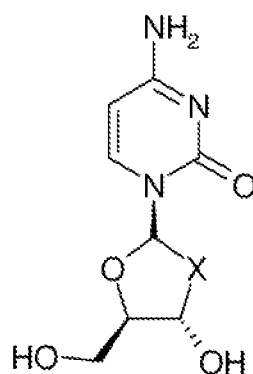
- a) Reazione di un alogenoformiato di formula (II)



(II)

in cui R è come sopra definito per i composti di formula (I) e Y è scelto tra cloro e bromo, preferibilmente cloro, con polvere di zinco attivata mediante trattamento acido;

- b) Aggiunta alla miscela di reazione ottenuta nel passaggio a) di un composto di formula (III)



(III)

in cui X è come definito per i composti di formula (I), per dare un composto di formula (I);

c) Isolamento del composto di formula (I).

Il passaggio a) viene preferibilmente condotto in un solvente etero quale ad esempio tetraidrofurano, etere etilico, diossano. Si opera utilizzando un eccesso molare di polvere di zinco attivata rispetto al composto di formula (II) pari a 1,2-3 volte, preferibilmente 1,5 volte, ad una temperatura compresa tra 10 e 30 °C, preferibilmente a temperatura ambiente e per un tempo di reazione compreso tra pochi minuti e 1 ora.

Il passaggio b) viene preferibilmente condotto sciogliendo il composto di formula (III) in un solvente quale dimetilsolfossido, *N,N*-dimetilformammide, preferibilmente in *N,N*-dimetilformammide, ad una temperatura compresa tra 20 e 50 °C. La soluzione del composto (III) così ottenuta viene quindi aggiunta alla miscela di reazione ottenuta nel passaggio a) e si lascia reagire a temperatura ambiente per un periodo compreso tra 24 ore e 48 ore, preferibilmente sotto flusso di azoto anidro.

L'isolamento del prodotto (passaggio c) avviene preferibilmente mediante filtrazione della miscela di reazione ottenuta nel passaggio b), seguita da ripartizione del filtrato tra una fase acquosa ed un solvente organico, quale

diclorometano, lavaggio con una soluzione acquosa leggermente alcalina, preferibilmente NaHCO_3 , tra 2 e 10%, preferibilmente 5%, evaporazione della fase organica e purificazione del residuo mediante metodi convenzionali, come ad esempio la cromatografia flash.

Il procedimento sopra descritto, che rappresenta un ulteriore oggetto dell'invenzione, non richiede la preventiva protezione del gruppo ossidrilico nella posizione 5' dei composti di formula (III).

I composti di formula (II) sono noti o preparabili con metodi noti, ad esempio per reazione di un alcool R-OH di formula (IV), in cui R è come definito per i composti di formula (I), con trifosgene.

I composti di formula IV sono noti o preparabili con metodi noti. Ad esempio, il composto di formula (IV) in cui R è il residuo 1,1',2-*tris-nor-squalenile* può essere preparato per riduzione con sodio boroidruro [45-47] della 1,1',2-*tris-nor-squalene aldeide* ottenuta come riportato [41-44].

L'invenzione riguarda anche nanoparticelle formate da un composto di formula (I), in particolare da un composto di formula (I), in cui R è un residuo 1,1',2-*tris-nor-squalenile* di formula (G), in un solvente polare, preferibilmente in una fase acquosa.

Le nanoparticelle dei composti dell'invenzione possono essere preparate mediante metodi noti, ad esempio mediante il classico metodo di Fessi di nanoprecipitazione [53]. Il composto di formula (I) viene disciolto in un solvente miscibile con acqua, quale ad esempio acetone, tetraidrofurano, metanolo, etanolo, preferibilmente acetone e versato lentamente in acqua distillata, sotto vigorosa agitazione, in modo da favorire l'autoassemblaggio delle nanoparticelle in modo ottimale. Il solvente utilizzato, insieme a parte

dell'acqua, viene quindi lasciato evaporare sotto vigorosa agitazione, preferibilmente a temperatura ambiente, fino a che tutto il solvente organico è evaporato (insieme a parte dell'acqua). Le nanoparticelle posseggono dimensioni medie da 50 a 250 nm, frequentemente da 90 a 150 nm, misurate mediante light-scattering. Per ridurre significativamente l'effetto di cattura e di distruzione da parte del sistema reticolo-endoteliale o sistema RES, le nanoparticelle possono essere rese invisibili o *stealth*, rivestendole preferibilmente con PEG o analoghi. Inoltre, possono essere veicolate verso i tumori bersaglio, rivestendole con opportuni ligandi, come ad esempio l'acido folico, la transferrina, lectine, aptameri, anticorpi, ecc.

Quando saggiati in un pannello di linee tumorali umane, i composti dell'invenzione, sono risultati più attivi di Gemcitabina e di Citarabina, nonché dei corrispondenti derivati ammidici descritti in FR 0451365 e WO/2006/090029.

Sorprendentemente, a fronte di una superiore attività citotossica nei confronti di cellule tumorali, i composti dell'invenzione possiedono una ridotta citotossicità aspecifica. In particolare i composti dell'invenzione presentano un minore effetto emolitico rispetto ai corrispondenti derivati ammidici descritti in FR 0451365 e WO/2006/090029, facendone pertanto prevedere una maggiore applicabilità clinica come farmaci antitumorali. Infatti, l'emolisi indotta da farmaci è una frequente complicazione associata alla chemioterapia. Essa dipende spesso dall'interazione del farmaco con la membrana degli eritrociti e porta alla lisi cellulare.

Esempi di tumori che possono essere vantaggiosamente trattati con i composti dell'invenzione sono i tumori di mammella, polmone, fegato,

colon-retto, vescica, prostata, ovaio, endometrio, stomaco, esofago, pancreas, rene, sarcoma dei tessuti molli, linfoma delle cellule T, linfoma di Hodgkin e linfoma non Hodgkin, testa e collo.

I composti dell'invenzione possono essere somministrati ad un paziente in dosi variabili da 0,1 mg a 1000 mg per Kg di peso corporeo al giorno. Una modalità di somministrazione preferita è quella che utilizza un dosaggio da circa 1 mg a circa 50 mg per Kg di peso corporeo al giorno, impiegando dosi unitarie tali da somministrare in 24 ore da circa 70 mg a circa 3,5 g della sostanza attiva ad un paziente con un peso di circa 70 Kg. Una tale modalità di somministrazione può essere aggiustata per ottenere un miglior effetto terapeutico. Ad esempio, le dosi possono essere aggiustate in considerazione della situazione terapeutica del paziente. I composti attivi secondo l'invenzione possono essere somministrati per via endovenosa, orale e per altre vie. La determinazione dei dosaggi e delle vie di somministrazione ottimali per un determinato paziente è ben nota all'esperto del settore.

I composti dell'invenzione, quando somministrati, secondo modalità terapeutiche ben note, in combinazione con altri agenti utilizzati per indurre la regressione di tumori, aumentano gli effetti antitumorali di detti composti in maniera sinergica.

Esempi dei composti che possono essere utilizzati in combinazione con i composti dell'invenzione sono rappresentati da docetaxel, paclitaxel, carboplatino, cisplatino, idarubicina, topotecano, fludarabicina, etoposide, daunorubicina, bevacizumab, gefitinib, erlotinib, trastuzumab, rituximab. I composti possono essere utilizzati anche in combinazione con la radioterapia. Questi utilizzi in combinazione dei composti dell'invenzione rappresentano un

ulteriore oggetto dell'invenzione.

Un altro oggetto della presente invenzione riguarda un composto di formula (I) in miscela con un eccipiente compatibile per l'uso farmaceutico.

Per l'uso terapeutico, i composti dell'invenzione possono essere opportunamente formulati con eccipienti o veicoli fisiologicamente accettabili. Le forme farmaceutiche adatte possono variare a seconda dello specifico composto e delle vie di somministrazione. Il dosaggio del principio attivo sarà determinato di volta in volta, sulla base della gravità della malattia da trattare e delle condizioni generali del paziente. Composizioni farmaceutiche opportune possono essere preparate seguendo le indicazioni riportate in Remington's Pharmaceutical Sciences, XVIII Ed. Mack Publishing Co. Le composizioni farmaceutiche secondo la presente invenzione contengono quantità terapeuticamente efficaci di almeno un composto secondo l'invenzione, in miscela con eccipienti compatibili con l'uso farmaceutico. Le composizioni per via orale comprendono generalmente vari eccipienti come un diluente inerte o un supporto edibile e possono essere racchiuse in capsule dure o molli o ridotte in compresse. Altre possibili forme di somministrazione per via orale sono rappresentate da polveri, granulati, soluzioni, sospensioni, emulsioni. Le compresse, le capsule e altre composizioni possono contenere i noti diluenti, leganti, granulanti, lubrificanti, disgreganti, aromatizzanti. A titolo di esempio, si possono citare i seguenti ingredienti, in aggiunta al composto di formula I: un legante, quale cellulosa microcristallina, gomma adragante o gelatina; un supporto quale amido o lattosio, un disgregante quale acido alginico, primogel, amido di mais e simili; un lubrificante quale magnesio stearato; un fluidificante quale biossido di silicio colloidale; un dolcificante quale saccarosio, aspartame,

ciclammati, saccarina, un aromatizzante quale aroma di menta, salicilato di metile o aroma d'arancia. Quando la composizione selezionata è in forma di capsule, essa può contenere in aggiunta un veicolo liquido quale un olio grasso. Altre composizioni possono contenere vari materiali, per esempio agenti di rivestimento per granulati e per compresse, quali zucchero o rivestimenti filmogeni. Possono essere sviluppate compresse a rilascio controllato, prolungato o ripetuto, aventi i noti polimeri di rivestimento dei granulati o delle compresse, quali cellulosa acetofalato, polimeri dell'acido acrilico, dell'acido metacrilico e similari, insolubili a pH acido e solubili a pH poco acido, neutro o leggermente alcalino. Quando i composti sono utilizzati in dispersione in una soluzione acquosa, possono essere associati a vari eccipienti, come tensioattivi, chelanti o sequestranti, antiossidanti, soluzioni tampone, agenti modificanti il pH.

Per la preparazione di composizioni farmaceutiche per somministrazione parenterale, l'ingrediente attivo può essere incluso in soluzioni, emulsioni o sospensioni, che possono contenere in aggiunta i seguenti componenti: un diluente sterile quale acqua per preparazioni iniettabili, soluzioni saline, oli, polietilenglicole, glicerina, glicol propilenico o altri solventi sintetici; agenti antibatterici quali alcool benzilico; antiossidanti quali acido ascorbico o sodio bisolfito; agenti chelanti quali acido etilendiamminotetracetico; tamponi quali acetati, citrati o fosfati e agenti per aggiustare la tonicità della soluzione, quali cloruro di sodio o destrosio, tensioattivi quali Tween o similari. Le preparazioni parenterali possono essere contenute in ampolle, siringhe monodose, fiale di vetro o plastica o contenere separatamente la polvere contenente il farmaco e la soluzione acquosa da miscelare al momento dell'uso.

L'invenzione è ulteriormente descritta dai seguenti esempi.

ESEMPI

Materiali e metodi

Gli spettri ^1H NMR sono stati registrati su un apparecchio Bruker 300 ultrashield (Karlsruhe, Germania) a temperatura ambiente, in genere con Me_4Si (TMS) come standard interno. Le costanti di accoppiamento (J) sono misurate in Hz. Gli spettri di massa sono stati registrati con uno spettrometro Finnigan MAT TSQ 700 (San Jose, CA). Le reazioni sono state monitorate mediante TLC su fogli di alluminio prerivestiti (Merck, Darmstadt, Germania); dopo l'eluizione, le TLC sono state esposte a vapori di iodio. La cromatografia flash su colonna è stata condotta su gel di silice di 230-400 mesh. Il tetraidrofurano è stato essiccato su sodio benzofenone chetile. Tutti i solventi sono stati distillati prima della cromatografia su colonna.

La Citarabina (1- β -D-arabinofuranosilcitosina, ARA-C) è stata acquistata dalla Sigma-Aldrich (Italia). La Gemcitabina base libera è stata acquistata da Lancrix Chemicals (Shanghai, Cina). L'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide è stata ottenuta dallo squalene utilizzando un metodo sviluppato in precedenza da alcuni di noi [41-44].

Preparazione 1

Oleil cloroformiato (*cis*-9-ottadecen-1-olo cloroformiato 2, Schema 1)

Il trifosgene (x 1, 1.10 g, 3.72 mmol) è stato disciolto in THF anidro (30 ml) a 0 °C, sotto flusso di azoto anidro e agitazione in un pallone a tre colli contenente un tappo perforabile, ed è stata aggiunta piridina anidra (x 1.2, 353 mg, 3.61 ml, 4.46 mmol) mediante una siringa, direttamente nella

soluzione, sotto agitazione, senza farla gocciolare sui bordi del pallone. Si è formato inizialmente un precipitato di colore giallo chiaro che in seguito si è disciolto. L'alcol oleico (*cis*-9-ottadecen-1-olo) **1** (1 g, 3.72 mmol) è stato disciolto in THF anidro (20 ml), aggiungendolo alla soluzione in 30 min, sotto agitazione, attraverso un imbuto gocciolatore, a 0°C, sotto azoto, mentre nel frattempo il colore del precipitato è virato al bianco, ed è stato lasciato reagire per 3 h a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata aggiunta lentamente (quasi goccia a goccia) a una soluzione acquosa al 3.7% di HCl (3.3 ml), agitando a 0°C, con sviluppo di effervescenza ed è stata lasciata per ulteriori 5 min. La miscela di reazione è stata estratta con etere di petrolio (50 ml x 3) lavata con una soluzione satura di NaCl, essiccata su solfato di sodio anidro ed evaporata sotto vuoto. Il completamento della reazione è stato evidenziato mediante sviluppo su TLC di gel di silice con etere di petrolio / etil acetato, 93:7. Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash con eluente etere di petrolio, fornendo 862 mg di oleil cloroformiato **2** con resa del 70%, come un solido oleoso bianco. ¹H NMR (CDCl₃): δ, 0.88 (3 H, t, CH₃), 1.25-1.33 (22 H, m, CH₂), 1.70 (2 H, m, CH₂CH₂O), 2.01 (4 H, m, CH₂ allilici), 4.30 (2 H, t, CH₂O), 5.35 (2 H, m, *cis* CH=CH). MS (CI): *m/z* 331 (M+1, 80), 329 (100).

Preparazione 2

1,1',2-*tris-nor*-squalene alcol (**5**, Schema 2)

L'1,1',2-*tris-nor*-squalene alcol **5** è stato ottenuto mediante riduzione dell'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide **1** con NaBH₄ [45-47]. L'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide **4** (1 g, 2.6 mmol), ottenuta a partire dallo squalene [41-44], è stata disciolta in metanolo (50 ml) ed è stato aggiunto sotto agitazione NaBH₄

(x 1.5, 148 mg, 3.9 mmol). Dopo 2 h, è stato evaporato il metanolo. E' stato aggiunto diclorometano (200 ml), la miscela è stata filtrata e lavata con una soluzione satura di NaCl (100 ml x 2), essiccata su solfato di sodio anidro ed evaporata sotto vuoto fino a secco. Il grezzo di reazione è stato controllato su TLC con eluente diclorometano e purificato mediante cromatografia flash con etere di petrolio per eliminare le impurezze, poi etere di petrolio / etere etilico, 99:1, fornendo 925 mg di 1,1',2-*tris-nor-squalene* alcol **5** con resa del 92%, come un solido oleoso di colore giallo pallido. ¹H-NMR (CDCl₃): δ, 1.55-1.72 (20 H, m, CH₃ allilici e CH₂CH₂OH), 1.95-2.15 (18 H, m, CH₂ allilici), 3.65 (2 H, t, CH₂OH), 5.05-5.25 (5 H, m, CH vinilici). MS (EI): *m/z* 386.

Preparazione 3

1,1',2-*tris-nor-squalenil* cloroformiato (6**, Schema 2)**

Il trifosgene x 2, 1.52 g, 5.12 mmol) è stato disciolto in THF anidro (40 ml) a 0°C, sotto flusso di azoto anidro e agitazione in un pallone a tre colli contenente un tappo perforabile, ed è stata aggiunta piridina anidra (x 2, 405 mg, 4.16 ml, 5.11 mmol) mediante una siringa, direttamente nella soluzione, sotto agitazione, senza farla gocciolare sui bordi del pallone. Si è formato inizialmente un precipitato di colore giallo chiaro che in seguito si è disciolto. L'1,1',2-*tris-nor-squalene* alcol **5** (990 mg, 2.56 mmol) è stato disciolto in THF anidro (20 ml), aggiungendolo alla soluzione in 30 min, sotto agitazione, mediante un imbuto gocciolatore, a 0°C, sotto azoto anidro, ed è stato lasciato reagire per 3 h a temperatura ambiente. La miscela di reazione è stata aggiunta lentamente (quasi goccia a goccia) a una soluzione acquosa al 3.7% di HCl (4.4 ml), a 0°C sotto agitazione, con sviluppo di effervescenza e lasciata per ulteriori 5 min. La miscela di reazione è stata estratta con etere di

petrolio (50 ml x 3) lavata con una soluzione satura di NaCl, essiccata su solfato di sodio anidro, filtrata su un filtro a pieghe ed evaporata sotto vuoto. Il completamento della reazione è stato evidenziato mediante sviluppo su TLC di gel di silice con etere di petrolio / etil acetato, 90:10. Il prodotto grezzo, 1,1',2-*tris-nor-squalenil* cloroformiato **6** è stato ottenuto, con elevato grado di purezza, con resa dell'88% (1.01 g, 2.25 mmol), come un olio viscoso che è stato usato direttamente nello stadio successivo. Esso non è stato purificato mediante cromatografia flash su gel di silice, in quanto si è degradato parzialmente durante le condizioni applicate nella cromatografia. ^1H NMR (CDCl_3): δ , 1.55-1.85 (20 H, m, CH_3 allilici e $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 1.95-2.15 (18 H, m, CH_2 allilici), 4.30 (2 H, t, CH_2O), 5.05-5.25 (5 H, m, CH vinilici). MS (CI): m/z 450 ($\text{M}+1$, 100).

Preparazione 4

1,1',2-*tris-nor-squalene* acido (9**, Schema 3)**

L'1,1',2-*tris-nor-squalene* acido **9** è stato ottenuto dalla reazione della *squalene* aldeide **4** con acido cromico, preparato con acido solforico acquoso a 0 °C e dicromato di potassio [50 e bibliografie ivi riportate]. L'1,1',2-*tris-nor-squalene* aldeide **4** (1.58 g, 4.12 mmol) è stata disciolta in etere etilico (20 ml) a 0° C. Separatamente, acido solforico (2.3 ml) è stato aggiunto a 0° C ad acqua distillata (20 ml) sotto agitazione, seguito da dicromato di potassio (x 1, 1.21 g, 4.12 mmol), fornendo acido cromico. Esso è stato aggiunto alla soluzione dell'aldeide **4** in etere etilico (preparata in precedenza), a 0° C per 20 minuti, e lasciata reagire per 2 h a 0° C, sotto agitazione. La miscela di reazione è stata estratta con etere etilico (50 ml x 3), lavata con una soluzione satura di NaCl (100 ml x 2), essiccata su solfato di sodio anidro ed evaporata a secco sotto

vuoto. Il completamento della reazione è stato rivelato mediante TLC di gel di silice, che è stata sviluppata con etere di petrolio /etere etilico /metanolo (70:23:7). Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash con etere di petrolio, poi etere di petrolio / etere etilico (95:5), fornendo 578 mg di 1,1',2-*tris-nor-squalene* acido **9** (resa 35%), come un olio incolore. ¹H NMR (CDCl₃): δ, 1.55-1.65 (18 H, m, CH₃ allilici), 1.90-2.10 (16 H, m, CH₂ allilici), 2.26 (2 H, t, CH₂CH₂COOH), 2.38 (2 H, t, CH₂CH₂COOH), 5.05-5.25 (5 H, m, CH vinilici), 12.20 (1 H, s allargato, COOH). MS (EI): *m/z* 400 (M⁺, 5), 357 (3), 331 (5), 289 (3), 208 (6), 136 (3), 81 (100).

Esempio 1

4-[(*N*)-oleilossicarbonil]-1β-(arabinofuranosil)citosina (3**, Schema 1)**

La polvere di zinco è stata attivata lavando un campione in commercio per un minuto con HCl al 2%, poi tre volte con acqua distillata, due volte con etanolo, una volta con acetone, infine una volta con etere etilico, su un setto poroso posto sotto vuoto, conservato sotto vuoto e utilizzato in breve tempo. L'oleil cloroformiato **2** (800 mg, 2.42 mmol) è stato disciolto in THF anidro (40 ml) in un pallone a tre colli, sotto flusso di azoto anidro, ed è stata aggiunta in una volta la polvere di Zinco attivata di recente (x 1.5, 237 mg, 3.63 mmol), ottenendo una sospensione grigia che è stata lasciata a reagire per 10 min. L'1β-(arabinofuranosil)citosina (Citarabina o ARA-C) (x 1.5, 885 mg, 3.63 mmol) è stata disciolta in DMF tiepida (8 ml) e poi aggiunta alla miscela di reazione mediante una siringa in 5 min, sotto agitazione, a temperatura ambiente, e lasciata reagire a temperatura ambiente per 24 h. Nel frattempo, il colore grigio scuro è virato prima a grigio chiaro e poi di nuovo a grigio scuro. La miscela di

reazione è stata filtrata su un filtro a pieghe e il precipitato è stato lavato con diclorometano (100 ml) formando una soluzione lattescente. È stata aggiunta una soluzione satura di NaCl e la soluzione è stata estratta con diclorometano (50 ml x 5) lavata con una soluzione acquosa di NaHCO₃ al 10% (100 ml), con una soluzione satura di NaCl (100 ml x 2), essiccata su solfato di sodio anidro ed evaporata sotto vuoto inizialmente mediante una pompa a basso vuoto e poi con una pompa ad alto vuoto, fornendo un prodotto grezzo. Questo è stato purificato mediante cromatografia flash con diclorometano, poi diclorometano / metanolo, 99:1, poi 99:2, per rimuovere le impurezze, e infine 97:3, fornendo 599 mg di 4-[(*N*)-oleilossicarbonil]-1β-(arabinofuranosil)citosina **3** con resa del 46% (rispetto all'oleil cloroformiato **2**), come un solido oleoso. ¹H-NMR (CD₃COCD₃): δ, 0.88 (3 H, t, CH₃), 1.25-1.33 (22 H, m, CH₂), 1.68 (2 H, m, CH₂CH₂O), 2.04 (4 H, m, CH₂ allilici), 3.87 (2 H, m, 5'-CH₂), 4.05-4.30 (3 H, vari m, 2'-CH, 3'-CH e 4'-CH), 4.16 (2 H, t, CH₂CH₂O), 4.60-4.95 (3 H, picchi allargati, OH), 5.35 (2 H, m, *cis* CH=CH), 6.10 (1 H, m, 1'-CH), 7.25 (1 H, m, citosina 5-CH), 8.17 (1 H, m, citosina 6-CH), 8.84 (1 H, s allargato, NHCOO). MS (CI): *m/z* 538 (M+1, 100).

I controlli di purezza effettuati dopo 30, 60 e 90 giorni mediante analisi TLC e ¹H-NMR sul composto conservato a temperatura ambiente per 90 giorni non hanno mostrato prodotti di degradazione.

Esempio 2

Con una procedura analoga a quella descritta nell'esempio 1, impiegando come prodotto di partenza la Gemcitabina al posto dell'1β-(arabinofuranosil)citosina, è stata preparata la 4-[(*N*)-oleilossicarbonil]gemcitabina.

Esempio 3

4-[(N)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]-1β-(arabinofuranosil)citosina (Sq-ARA-C carbammato) (7, Schema 2)

4-[(N)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]-1β-(arabinofuranosil)citosina **7** è stata ottenuta partendo dall'1,1',2-*tris-nor*-squalenil cloroformiato **6** mediante il metodo sviluppato per la sintesi di 4-[(N)-oleilossicarbonil]-1β-(arabinofuranosil)citosina **3**, con resa del 45%. ¹H-NMR (CD₃COCD₃): 1.58-1.68 (18 H, m, CH₃ squalenici allilici), 1.76 (2 H, pseudo quintupletto, CH₂CH₂O squalenici), 1.95-2.15 (18 H, m, CH₂ squalenici allilici), 3.87 (2 H, m, 5'-CH₂), 4.05-4.30 (3 H, vari m, 2'-CH, 3'-CH e 4'-CH), 4.16 (2 H, t, CH₂CH₂O), 4.60-5.00 (3 H, picchi allargati, OH), 5.05-5.25 (5 H, m, CH squalenici vinilici), 6.19 (1 H, d, 1'-CH), 7.16 (1 H, d, citosina 5-CH), 8.18 (1 H, d, citosina 6-CH), 9.24 (1 H, s allargato, NHCOO). MS (ES⁻): *m/z* 654 (M-1, 100).

I controlli di purezza effettuati dopo 30, 60 e 90 giorni mediante analisi TLC e ¹H-NMR sul composto conservato a temperatura ambiente per 90 giorni non hanno mostrato prodotti di degradazione.

Esempio 4

4-[(N)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]gemcitabina (8, Schema 2) (Sq-GEM carbammato)

La 4-[(N)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]gemcitabina **8** è stata ottenuta partendo dall'1,1',2-*tris-nor*-squalenil cloroformiato **6** utilizzando un metodo simile a quello sviluppato per la sintesi di 4-[(N)-oleilossicarbonil]-1β-(arabinofuranosil)citosina **3**, lasciando reagire per 48 h a temperatura ambiente, con resa del 31%. ¹H NMR (CD₃COCD₃): δ, 1.58-1.68 (18 H, m, CH₃ squalenici

allilici), 1.78 (2 H, pseudo quintupletto, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$ squalenico), 1.95-2.15 (18 H, m, CH_2 squalenici allilici), 3.87 (1 H, m, 5'-b-CH), 4.03 (2 H, m, 4'-CH e 5'-a-CH), 4.16 (2 H, t, CH_2O squalenico), 4.46 (1 H, m, 3'-CH), 4.54 (1 H, t, 5'-OH), 5.05-5.25 (5 H, m, CH squalenici vinilici), 5.42 (1 H, d, 3'-OH), 6.28 (1 H, t, 1'-CH), 7.23 (1 H, d, citosina 5-CH), 8.28 (1 H, d, citosina 6-CH), 9.38 (1 H, s allargato, NHCOO). MS (ES-): m/z 674 (M-1, 100).

I controlli di purezza effettuati dopo 30, 60 e 90 giorni mediante analisi TLC e ^1H -NMR sul composto conservato a temperatura ambiente per 90 giorni non hanno mostrato prodotti di degradazione.

Esempio comparativo 1

4-[(N)-1,1',2-*tris-nor-squalenoil*]-1 β -(arabinofuranosil)citosina (Sq-ARA-C ammide) (10, Schema 3)

L'1,1',2-*tris-nor-squalene* acido **9** (338 mg, 0.845 mmol) è stato disciolto in THF anidro (5 ml) in un pallone a tre colli, sotto flusso di azoto anidro e agitazione, seguito dall'aggiunta di trietilammina (x 1, 85.5 mg, 0.845 mmol) in THF anidro (2 ml), ed è stato raffreddato a 0° C. E' stato aggiunto etil cloroformiato (91.7 mg, 0.845 mmol), disciolto in THF anidro (80 ml), a 0° C per 20 min, sotto agitazione, seguito dall'aggiunta di 1 β -(arabinofuranosil)citosina (205.92 mg, 0.845 mmol) disciolta in DMF anidra e tiepida (5 ml), a causa della sua scarsa solubilità. Dopo aver raggiunto la temperatura ambiente, la miscela di reazione è stata lasciata reagire per 3 giorni, sotto flusso di azoto anidro e agitazione. Il procedere della reazione è stato monitorato su TLC di gel di silice, che è stata sviluppata con diclorometano / acetone (95:5). Il prodotto grezzo è stato purificato mediante cromatografia flash con diclorometano, poi diclorometano / acetone, (85:15) e infine

diclorometano / acetone (75:25), fornendo 296 mg di 4-[(*N*)-1,1',2-*tris-nor-squalenoil*]-1 β -(arabinofuranosil)citosina (Sq-ARA-C ammide) **10** (resa 56%), come un olio viscoso incolore [52]. ¹H-NMR (CD₃COCD₃): δ , 1.58-1.68 (18 H, m, CH₃ squalenici allilici), 1.95-2.15 (16 H, m, CH₂ squalenici allilici), 2.35 (2 H, t, NHCOCH₂CH₂ squalenico), 2.64 (2 H, t, NHCOCH₂ squalenico), 3.88 (2 H, m, 5'-CH₂), 4.08 (1 H, m, 4'-CH), 4.24-4.30 (2 H, m, 2'-CH e 3'-CH), 4.65-5.00 (3 H, picchi allargati, OH), 5.05-5.25 (5 H, m, CH squalenici vinilici), 6.19 (1 H, d, 1'-CH), 7.33 (1 H, d, citosina 5-CH), 8.20 (1 H, d, citosina 6-CH), 9.58-9.68 (1 H, s allargato, NHCO). ¹H-NMR (CD₃OD): δ , 1.58-1.68 (16 H, m, CH₃ squalenici allilici), 1.95-2.15 (16 H, m, CH₂ squalenici allilici), 2.35 (2 H, t, NHCOCH₂CH₂ squalenico), 2.54 (2 H, t, NHCOCH₂ squalenico), 3.90 (2 H, m, 5'-CH₂), 4.03 (1 H, m, 4'-CH), 4.10 (1 H, m, 3'-CH), 4.25 (1 H, m, 2'-CH), 5.05-5.25 (5 H, m, CH squalenici vinilici), 6.19 (1 H, d, 1'-CH), 7.43 (1 H, d, citosina 5-CH), 8.24 (1 H, d, citosina 6-CH), 9.05 (1 H, s allargato, NHCO). MS (CI): *m/z* 626 (M⁺, 100), 609 (65).

Esempio comparativo 2

4-[(*N*)-1,1',2-*tris-nor-squalenoil*]gemcitabina (Sq-GEM ammide) (11**, Schema 3)**

La 4-[(*N*)-1,1',2-*tris-nor-squalenoil*]gemcitabina **11** è stata ottenuta con il metodo descritto per il composto **10** [36,37], con resa del 45%. ¹H-NMR (CD₃OD): δ , 1.55-1.65 (16 H, m, CH₃ squalenici allilici), 1.90-2.15 (16 H, m, CH₂ squalenici allilici), 2.33 (2 H, t, NHCOCH₂CH₂ squalenico), 2.55 (2 H, t, NHCOCH₂ squalenico), 3.81 (1 H, m, 4'H), 3.97 (2 H, m, 5'-CH₂), 4.31 (1 H, m, 3'H), 5.05-5.20 (5 H, m, CH squalenici vinilici), 6.26 (1 H, m, 1'-CH), 7.48 (1 H, d, citosina 5-CH), 8.33 (1 H, d, citosina 6-CH), 10.49 (1 H, s allargato,

NHCO). ¹H-NMR (CDCl₃): δ, 1.55-1.65 (18 H, m, CH₃ squalenici allilici), 1.90-2.15 (16 H, m, CH₂ squalenici allilici), 2.28-2.38 (2 H, m, NHCOCH₂CH₂ squalenico), 2.55 (2 H, m, NHCOCH₂ squalenico), 4.09-4.16 (3 H, m, H4' e H5'), 4.49 (1 H, m, H3'), 5.05-5.25 (5 H, m, CH squalenici vinilici), 6.18 (1 H, t, H1'), 7.47 (1 H, d, citosina H5), 8.16 (1 H, d, citosina H6), 9.15 (1 H, s allargato, NHCO). MS (CI, isobutano): *m/z* 646 (M⁺, 100); (EI) *m/z* 645 (M⁺, 10), 577 (8), 523 (7), 509 (18), 494 (10), 454 (15), 429 (24), 372 (100).

Esempio 5

Preparazione e caratterizzazione delle nanoparticelle di Sq-ARA-C carbammato e Sq-ARA-C ammidi (Tabella 1)

Le nanoparticelle possono essere preparate mediante il metodo di Fessi di nanoprecipitazione [53]. Il derivato idoneo (10 mg) è stato disciolto in acetone (0.5 ml + 0.1 ml due volte per lavaggio) e acqua distillata pura milliQ (10 ml), goccia a goccia, in circa 5 min, sotto vigorosa agitazione con un agitatore magnetico impostato a rotazione elevata, in modo da favorire l'autoassemblaggio delle nanoparticelle in modo ottimale. L'acetone utilizzato (insieme a parte dell'acqua) è stato evaporato a temperatura ambiente sotto vigorosa agitazione, fino a che il volume totale della sospensione si è ridotto da circa 10.7 ml a circa 8-9 ml. Il volume finale della sospensione è stato misurato con una pipetta graduata, permettendo così di calcolare la concentrazione finale delle nanoparticelle, che sono state conservate al buio, in vials di vetro a + 4 °C circa. Dopo un mese, le dimensioni medie e l'indice di polidispersità delle nanoparticelle (vedi parte seguente) sono risultati quasi invariati. Le dimensioni medie e l'indice di polidispersità delle nanoparticelle di Sq-Ara-C carbammato e Sq-ARA-C ammidi sono state valutate mediante la tecnica dello light-

scattering dinamico. L'analisi dimensionale è stata condotta mediante la spettroscopia di fotocorrelazione (PCS) (Nanosizer Nano ZS, Malvern Instruments Ltd., Spring Lane South, Worcs, Gran Bretagna), usando un laser 4.5 mW operante a 670 nm. Gli esperimenti sono stati condotti a un angolo di back-scattering di 173°. I campioni sono stati diluiti con acqua MilliQ®, per evitare fenomeni di multiscattering e posti in una cuvetta di quarzo. Gli esperimenti sono stati condotti a temperatura ambiente. Per ogni campione sono state condotte trenta diverse misure. Lo Zetasizer Nano ZS è stato anche usato per la determinazione del potenziale Z, applicando una costante di Smoluchowsky F (Ka) di 1.5 per calcolare il valore del potenziale Z in funzione della mobilità elettroforetica dei nanosistemi. Le varie misurazioni sono state condotte in triplicato su tre diversi campioni (10 determinazioni per ogni campione). I risultati sono stati espressi come la media di tre diversi esperimenti $\pm$ deviazione standard e sono riportati in Tabella 1.

Nanoparticelle di 4-[(N)-squalenoil]-1 β -(arabinofuranosil)citosina (Sq-ARA-C ammide).

L'analisi dei nanosistemi mediante light-scattering dinamico ha mostrato un diametro medio di circa 146 nm con un indice di polidispersità di ~ 0.09 (distribuzione dimensionale altamente omogenea) (Tabella 1). Inoltre, è stata misurata una carica superficiale di circa -26 mV.

Nanoparticelle di 4-[(N)-(1,1',2-tris-nor-squalenilossicarbonil)]-1 β -(arabinofuranosil)citosina (Sq-ARA-C carbammato).

L'analisi dei nanosistemi mediante light-scattering dinamico ha mostrato un diametro medio di circa 140 nm con un indice di polidispersità di ~ 0.09 (distribuzione dimensionale altamente omogenea) (Tabella 1). Inoltre, è stata

misurata una carica superficiale di circa -18 mV.

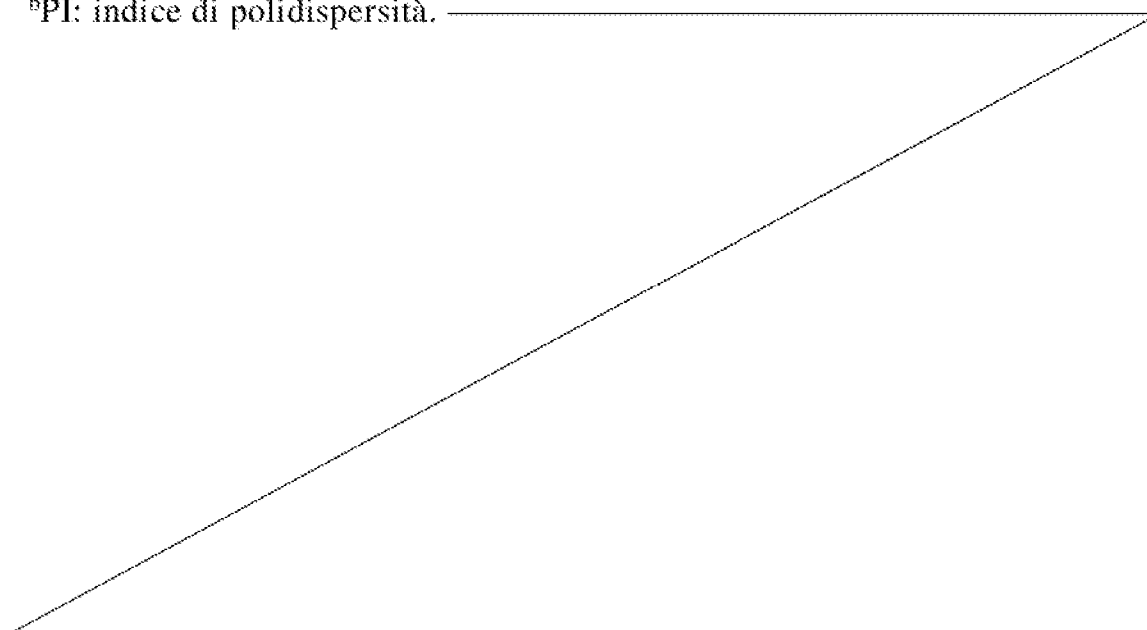
Questi valori rappresentano dei parametri che assicurano ai nanoaggregati delle proprietà biofarmaceutiche ideali; infatti vari studi hanno dimostrato che le dimensioni medie e le cariche superficiali possono influenzare la biodistribuzione di un sistema colloidale dopo somministrazione endovenosa. In particolare, un diametro del nanosistema di meno di 200 nm permette una sua lunga permanenza in circolo.

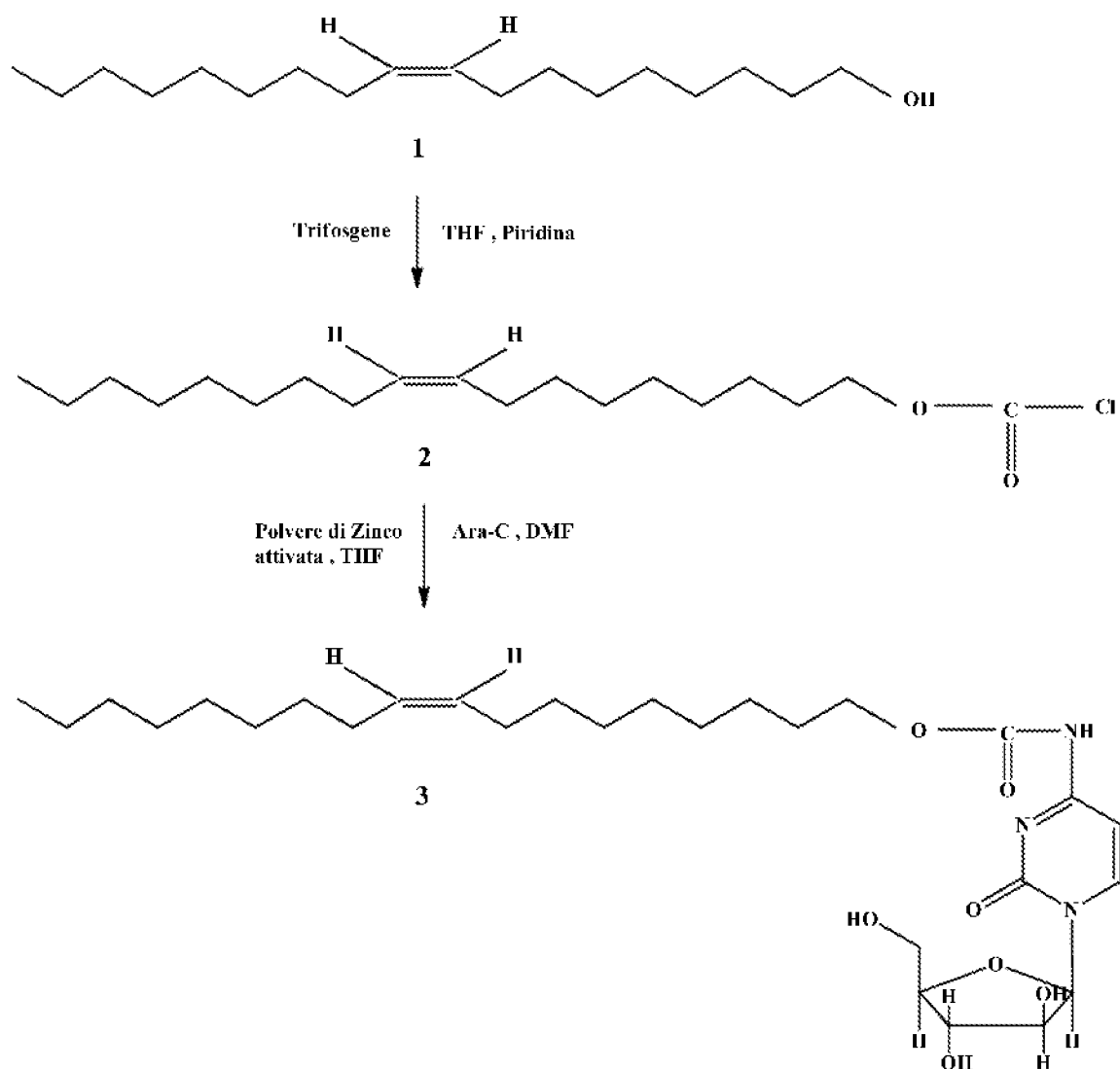
Tabella 1 Parametri fisico-chimici delle nanoparticelle dei derivati dello squalene^a.

Campioni	Dimensione (nm)	PI ^b	Potenziale Z
Sq-ARA-C ammide nanomedicina	146,1 ± 6,7	0,09 ± 0,015	-26,5 ± 3,1
Sq-ARA-C carbammato nanomedicina	139,5 ± 6,1	0,09 ± 0,018	-18,2 ± 4,4

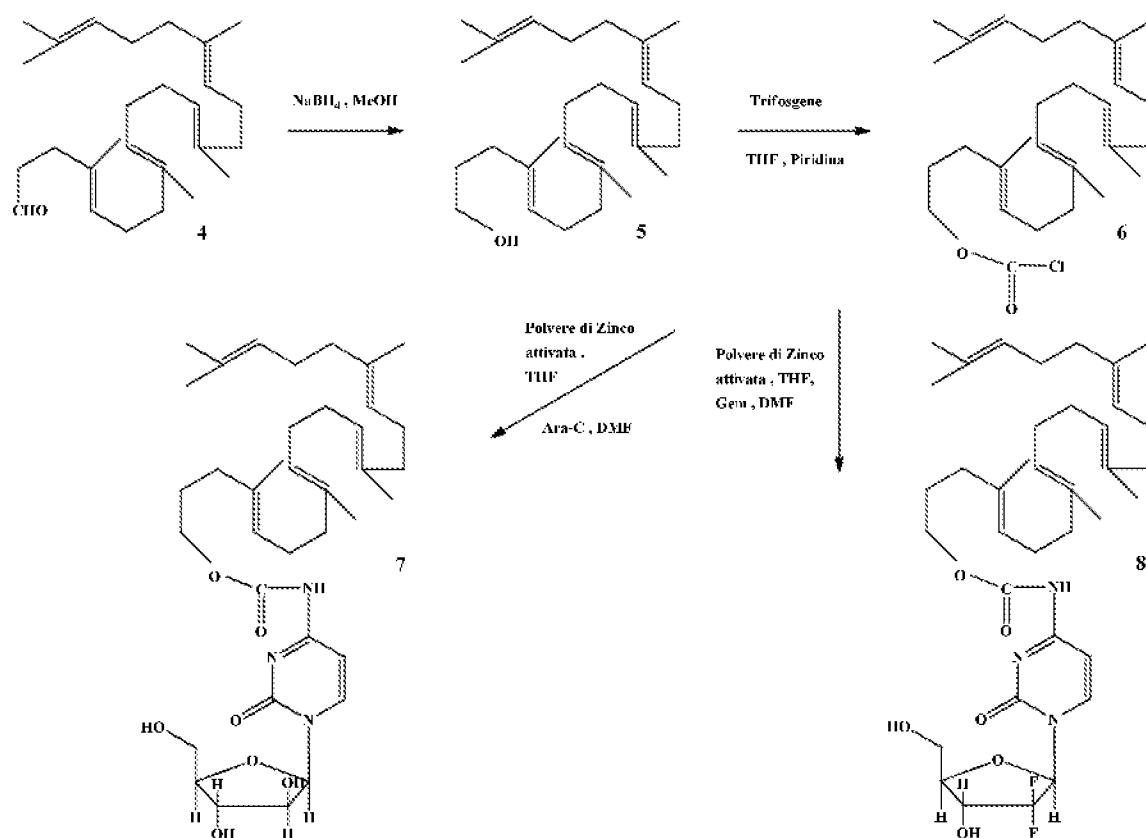
^aOgni valore rappresenta la media di tre diversi esperimenti ± deviazione standard.

^bPI: indice di polidispersità.



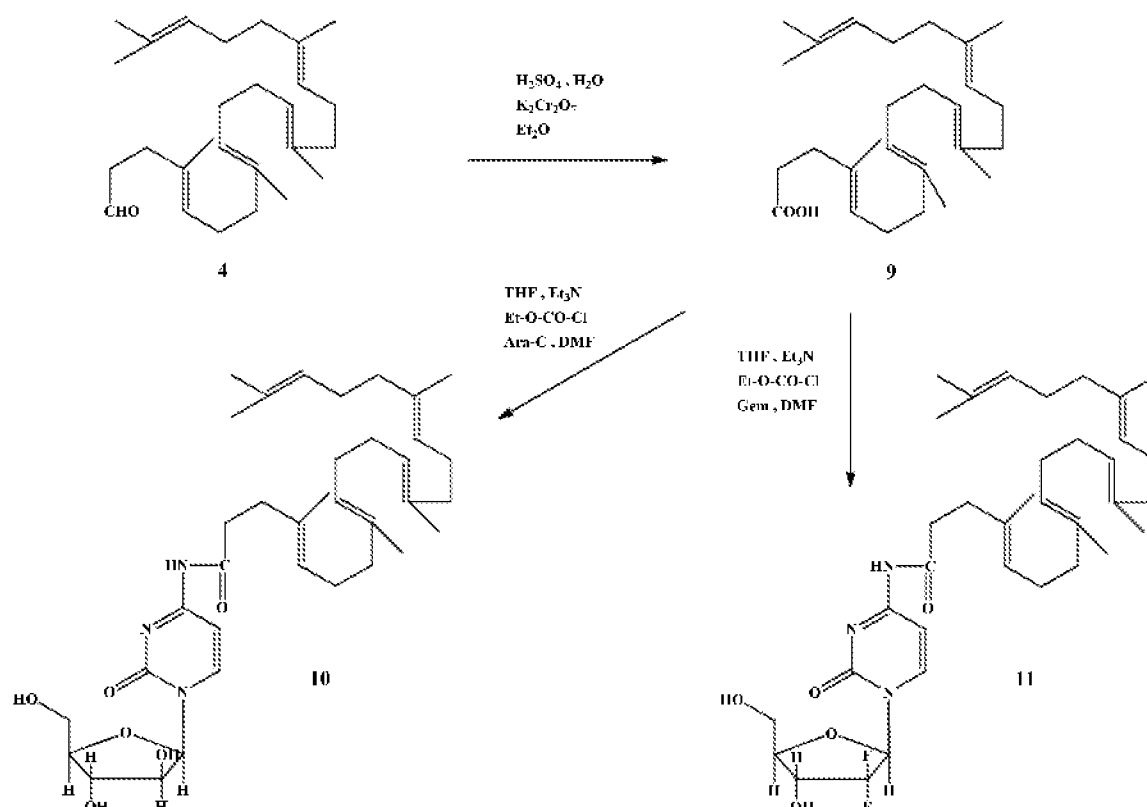


Schema 1 Sintesi di 4-[(*N*)-oleilossicarbonil]-1β-(arabinofuranosil)citosina **3**, dall'alcol oleico **1**.



Schema 2 Sintesi dei 1,1',2-*tris-nor*-squalenil-carbammati dell'ARA-C

7 e della Gemcitabina **8**, dall'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide **4**.



Schema 3 Sintesi delle 1,1',2-*tris-nor*-squalenoil-ammidi dell'ARA-C **10** e della Gemcitabina **11**, dall'1,1',2-*tris-nor*-squalene aldeide **4**.

Esempio 6

Caratterizzazione farmacologica

Preparazione dei farmaci

I composti in studio sono stati inizialmente disciolti in etanolo per preparare soluzioni di stoccaggio a concentrazione 25 mM che sono state conservate a -20°C fino all'uso. Per i diversi esperimenti, un'aliquota di ciascuna soluzione 25 mM è stata diluita con etanolo contenente Tween 80 al 10%, portata a secco sotto corrente d'azoto e risospesa con terreno completo, al fine di ottenere una soluzione 15 volte più concentrata rispetto alla massima concentrazione da esaminare. Mediante successive diluizioni si sono ottenute soluzioni ad opportune concentrazioni intermedie. 20 μl di ciascuna soluzione intermedia sono stati trasferiti in piastre a 96 pozzetti già contenenti in ciascun

pozzetto 100 μ l di terreno, in modo da ottenere per ciascun farmaco le concentrazioni finali desiderate. Per quanto riguarda i derivati di ARA-C (Sq-ARA-C ammide, Sq-ARA-C carbammato e Oleil-ARA-C carbammato), le concentrazioni studiate sono state: 5-10-20-40 μ M, mentre per ARA-C si sono usate concentrazioni pari a: 0,1-1-10-100 μ M nel caso delle cellule MCF-7 o pari a quelle dei derivati nelle cellule PC-3. Nelle cellule PC-3, Sq-ARA-C ammide e Sq-ARA-C carbammato sono stati studiati anche in forma di nanoparticelle; in questo caso le concentrazioni usate sia per loro che per ARA-C sono state le seguenti: 0,1-1-10-100 μ M. Per la Gemcitabina (GEM) e i suoi derivati Sq-GEM ammide e Sq-GEM carbammato, le concentrazioni utilizzate sono state: 1-4-8-16-32 μ M. La concentrazione finale di Tween 80 è stata mantenuta costante in tutti i pozzetti e pari allo 0,0065%, concentrazione alla quale il Tween 80 è risultato privo di effetti antiproliferativi. Le cellule di controllo sono state esposte alla stessa concentrazione di Tween 80.

Valutazione dell'attività citostatica e citotossica.

L'attività antitumorale dei composti è stata valutata nelle cellule MCF-7 di carcinoma mammario estrogeno-dipendente e nelle cellule PC-3 di carcinoma prostatico androgeno-resistente e ad alto potenziale metastatico. La vitalità cellulare è stata valutata utilizzando il test MTT ([4,5dimetiltiazol-2-il]-3,5-difeniltetrazolio bromuro) che misura l'attività deidrogenasica mitocondriale [54]. Le cellule sono state seminate in piastre a 96 pozzetti, a concentrazioni diverse a seconda del tempo di duplicazione di ciascuna linea cellulare (1000 cellule per pozzetto per le cellule MCF-7 e 5000 cellule per pozzetto per le cellule PC-3) e sono state incubate per 24 ore in terreno RPMI 1640 arricchito con SFB al 10%, L-glutamina 2mM e penicillina/streptomicina

(10000 U di penicillina e 10 mg di streptomycin per mL in NaCl allo 0,9%) in condizioni di coltura standard (37°C, atmosfera umidificata al 95% di aria e 5% di anidride carbonica). Dopo 24 ore, una piastra di ciascuna linea cellulare è stata trattata con MTT, secondo le modalità sotto descritte, per determinare il valore della vitalità cellulare al tempo zero, nelle restanti piastre il terreno è stato rinnovato con terreno fresco contenente concentrazioni crescenti dei farmaci in studio. Allo scadere del periodo di trattamento (48 ore), le cellule sono state incubate per 4 ore, al buio e a 37°C, con 20 µl di MTT, preparato fresco in terreno, alla concentrazione di 5 mg/ml. I cristalli di formazano formati nelle cellule sono stati solubilizzati con 200 µl di DMSO. La densità ottica di ciascun pozzetto è stata letta a 540 nm mediante un lettore di piastre (Model BiochromAsys UVM 340) ed è stata espressa come percentuale di quella delle cellule di controllo. Per ciascuna concentrazione di farmaco in studio sono stati allestiti 16 pozzetti e ogni esperimento è stato ripetuto tre volte. Per ogni farmaco sono stati calcolati i seguenti parametri: GI₅₀, TGI e LC₅₀. GI₅₀ è la concentrazione di farmaco che induce un'inibizione della crescita cellulare pari al 50%, TGI è la concentrazione di farmaco che provoca l'arresto totale della crescita cellulare e LC₅₀ è la concentrazione di farmaco capace di provocare la morte del 50% delle cellule.

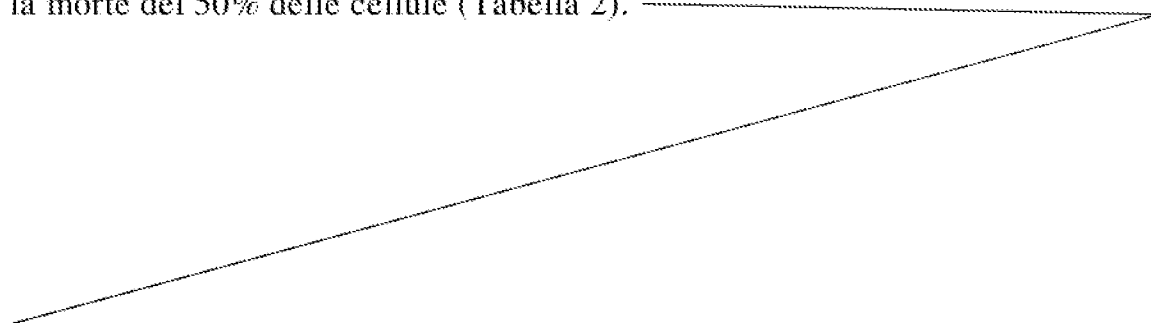
Valutazione dell'attività emolitica.

L'attività emolitica dei farmaci in studio è stata valutata in sangue intero eparinizzato di donatori sani adulti, entro 24 ore dal prelievo [55]. Il sangue è stato lavato 3 volte per centrifugazione a 437 x g (1400 rpm) con PBS e quindi risospeso in PBS preriscaldato a 37°C, ad una concentrazione pari al 10% dell'ematocrito. I farmaci da analizzare, disciolti in Tween 80 e diluiti in PBS,

sono stati aggiunti agli eritrociti alle stesse concentrazioni utilizzate negli esperimenti sull'attività antiproliferativa, facendo in modo che la concentrazione finale degli eritrociti corrispondesse allo 0,1% dell'ematocrito e che la concentrazione finale del Tween 80 fosse pari allo 0,0065%. I campioni sono stati incubati a 37°C per 3 ore, sotto agitazione. Il protocollo comprendeva un controllo positivo, costituito da eritrociti allo 0,1% incubati in parallelo in presenza di Triton X-100 allo 0,1%, e un controllo negativo formato da eritrociti allo 0,1% in PBS contenente Tween 80 allo 0,0065%. Allo scadere delle 3 ore, i campioni sono stati centrifugati per 5 minuti a 3112 x g (3700 rpm) e 100 µl di ciascun surnatante sono stati trasferiti in piastre a 96 pozzetti. L'assorbanza di ciascun pozzetto è stata valutata a 405 nm mediante un lettore di piastre (Model BiochromAsys UVM 340). L'attività emolitica di ciascuna concentrazione è stata espressa come percentuale del controllo positivo dopo avere corretto tutti i valori rispetto al controllo negativo.

Risultati

Nelle cellule di tumore mammario MCF-7, a livello delle quali abbiamo ottenuto valori di GI₅₀ per Sq-ARA-C ammide sovrapponibili a quelli della letteratura [52], i composti dell'invenzione Sq-ARA-C carbammato e Oleil-ARA-C carbammato sono risultati più efficaci di Sq-ARA-C ammide, sia per quanto riguarda la capacità di arrestare la crescita cellulare, sia nel determinare la morte del 50% delle cellule (Tabella 2).



Tab. 2: GI_{50} , TGI e LC_{50} di ARA-C, Sq-ARA-C ammido, Sq-ARA-C carbammato e Oleil-ARA-C carbammato nelle cellule MCF-7

	GI_{50} (μM)	TGI (μM)	LC_{50} (μM)
ARA-C	n.d.	n.d.	n.d.
Sq-ARA-C ammido	$17,87 \pm 6,3$	$124,9 \pm 38$	$864,36 \pm 230$
SQ-ARA-C carbammato	$9,99 \pm 0,85$	$21,93 \pm 3,2 *$	$48,16 \pm 7,2 *$
Oleil-ARA-C carbammato	$11,34 \pm 2,62$	$23,1 \pm 10,2 *$	$48,2 \pm 23 *$
Analisi statistica	ANOVA: $p=0,104$	ANOVA: $p=0,002$ Newman-Keuls: $*p<0,05$ vs Sq-AM	ANOVA: $p=0,000$ Newman-Keuls: $*p<0,05$ vs Sq-AM

Sq-AM = Sq-ARA-C ammido

Nelle cellule PC-3 di tumore prostatico, dove Sq-ARA-C ammido e Sq-ARA-C carbammato sono stati studiati sia in forma di nanoparticelle, sia solubilizzati con Tween 80, Sq-ARA-C ammido nanoparticelle e Sq-ARA-C carbammato nanoparticelle sono risultati in grado di arrestare la crescita cellulare, a differenza di ARA-C totalmente priva di efficacia. Il confronto tra Sq-ARA-C carbammato e Sq-ARA-C ammido ha messo in evidenza che il derivato carbammico è più efficace di quello ammidico per quel che riguarda l'arresto della crescita cellulare e l'induzione della morte nel 50% delle cellule (Tabella 3).

Tab. 3: GI_{50} , TGI e LC_{50} di ARA-C, Sq-ARA-C ammido_n, Sq-ARA-C carbammato_n nelle cellule **PC-3**

	GI_{50} (μM)	TGI (μM)	LC_{50} (μM)
ARA-C	n.d.	n.d.	n.d.
Sq-ARA-C ammido_n	$0,99 \pm 0,11$	$5,18 \pm 0,21$	$26,8 \pm 1,05$
Sq-ARA-C carbammato_n	$0,87 \pm 0,010$	$4,3 \pm 0,13$ *	$21,5 \pm 0,95$ *
Analisi statistica	P=0,133	Student t test: * p<0,05 vs Sq-ARA-C ammido	Student t test: * p<0,05 vs Sq-ARA-C ammido

_n = nanoparticelle

Nelle stesse cellule, gli effetti dei due derivati squalenici solubilizzati in Tween 80 sono stati confrontati con quelli dell'Oleil-ARA-C carbammato, preparato nelle stesse condizioni. Sq-ARA-C carbammato e Oleil-ARA-C carbammato si sono dimostrati complessivamente più efficaci del derivato ammidico. L'Oleil carbammato è risultato il più efficace tra i tre nel ridurre la crescita cellulare del 50%, lo Sq-carbammato il più attivo nel determinare la morte del 50% delle cellule (Tabella 4).

Tab. 4: GI₅₀, TGI e LC₅₀ di ARA-C, Sq-ARA-C ammido, Sq-ARA-C carbammato e Oleil-ARA-C carbammato nelle cellule **PC-3**

	GI ₅₀ (μM)	TGI (μM)		LC ₅₀ (μM)
ARA-C	n.d.	n.d.		n.d.
Sq-ARA-C ammido	7,35 ± 0,10	31,55 ± 1,07 *		102,48 ± 2,5 *
Sq-ARA-C carbammato	6,74 ± 0,18	15,73 ± 0,90		36,69 ± 1,30
Oleil-ARA-C carbammato	4,04 ± 0,85 *	15,70 ± 1,09		54,00 ± 6,00 #
Analisi statistica	ANOVA: p=0,000 Newman-Keuls: *p<0,05 vs Sq-AM e Sq-CAR	ANOVA: p=0,000 Newman-Keuls: *p<0,05 vs Sq-CAR e Oleil-CAR		ANOVA: p=0,000 Newman-Keuls: *p<0,05 vs Sq-CAR e Oleil-CAR #p<0,05 vs Sq-CAR

Sq-AM = Sq-ARA-C ammido; Sq-CAR = Sq-ARA-C carbammato ;
Oleil-CAR= Oleil-ARA-C carbammato

Per quanto riguarda Sq-GEM carbammato, la sua attività è stata studiata sia nelle cellule MCF-7, sia nelle PC-3 rispetto a GEM e al già noto Sq-GEM ammido. Nelle MCF-7 il nuovo derivato è apparso più efficace di Sq-GEM ammido nell'arrestare la crescita cellulare e nel determinare la morte cellulare (Tabella 5).

Tab. 5: GI_{50} , TGI e LC_{50} di GEM, Sq-GEM ammide, Sq-GEM carbammato nelle cellule **MCF-7**

	GI_{50} (μ M)	TGI (μ M)	LC_{50} (μ M)
GEM	285 $\pm$ 42	>100 M	>1000 M
Sq-GEM ammide	4,43 $\pm$ 0,27 *	14,7 $\pm$ 1,7	49 $\pm$ 7,5
Sq-GEM carbammato	3,17 $\pm$ 0,38 *	10,05 $\pm$ 1,58 *	32,44 $\pm$ 6,98 *
Analisi statistica	ANOVA: p=0,000 Newman-Keuls: *p<0,05 vs GEM	Student t-test: p=0,026 *p<0,05 vs Sq-GEM ammide	Student t-test: p=0,049 *p<0,05 vs Sq-GEM ammide

Sq-GEM carbammato si è rivelato più efficace di Sq-GEM ammide anche nelle cellule PC-3. Infatti anche nelle cellule PC-3, Sq-GEM carbammato si è rivelato più efficace dell'ammide per quanto riguarda l'arresto della crescita cellulare e l'induzione della morte nel 50 % delle cellule (Tabella 6).

Tab. 6: GI_{50} , TGI e LC_{50} di GEM, Sq-GEM ammide, Sq-GEM carbammato nelle cellule **PC-3**

	GI_{50} (μ M)	TGI (μ M)	LC_{50} (μ M)
GEM	142 $\pm$ 26	>20 mM	>3M
Sq-GEM ammide	5,02 $\pm$ 0,9 *	12,5 $\pm$ 0,4	28,6 $\pm$ 4,8
Sq-GEM carbammato	3,45 $\pm$ 1,15 *	8,15 $\pm$ 2,35 *	19,25 $\pm$ 4,75
Analisi statistica	ANOVA: p=0,000 Newman-Keuls: *p<0,05 vs GEM	Student t-test: p=0,034 *p<0,05 vs Sq-GEM ammide	Student t-test: p=0,073

Valutazione dell'attività emolitica dei composti in studio

L'attività emolitica dei diversi farmaci è stata valutata incubando una quantità prefissata di globuli rossi con i farmaci in studio a concentrazioni nel range di quelle impiegate negli esperimenti sull'attività citostatica e citotossica.

Essendo gli eritrociti privi di nucleo, essi sono insensibili agli effetti dei farmaci sul ciclo cellulare, perciò l'emolisi provocata dai singoli farmaci può essere interpretata come indice di tossicità aspecifica. L'emolisi è uno dei maggiori problemi associati con molti farmaci chemioterapici. Negli ultimi anni sono state sviluppate varie strategie per ottenere antitumorali o loro formulazioni con elevato indice terapeutico e ridotti effetti collaterali, ma i risultati per quanto riguarda la loro attività emolitica, spesso sono stati deludenti, come viene discusso in una recente review [56].

La Figura 1 riporta i valori ottenuti per quanto riguarda Sq-ARA-C carbammato e Oleil-ARA-C carbammato comparati rispetto ad ARA-C e Sq-ARA-C ammido. ARA-C è risultata priva di attività emolitica, mentre Sq-ARA-C ammido ha mostrato, a partire dalla concentrazione 5 μ M, un'attività emolitica significativamente maggiore, non solo di quella di ARA-C, ma anche di quella di tutte le concentrazioni studiate di Oleil-ARA-C carbammato. Per quel che riguarda il confronto tra Sq-ARA-C ammido e Sq-ARA-C carbammato, l'analisi statistica ha messo in evidenza che l'ammido ha un potere emolitico maggiore rispetto al carbammato.

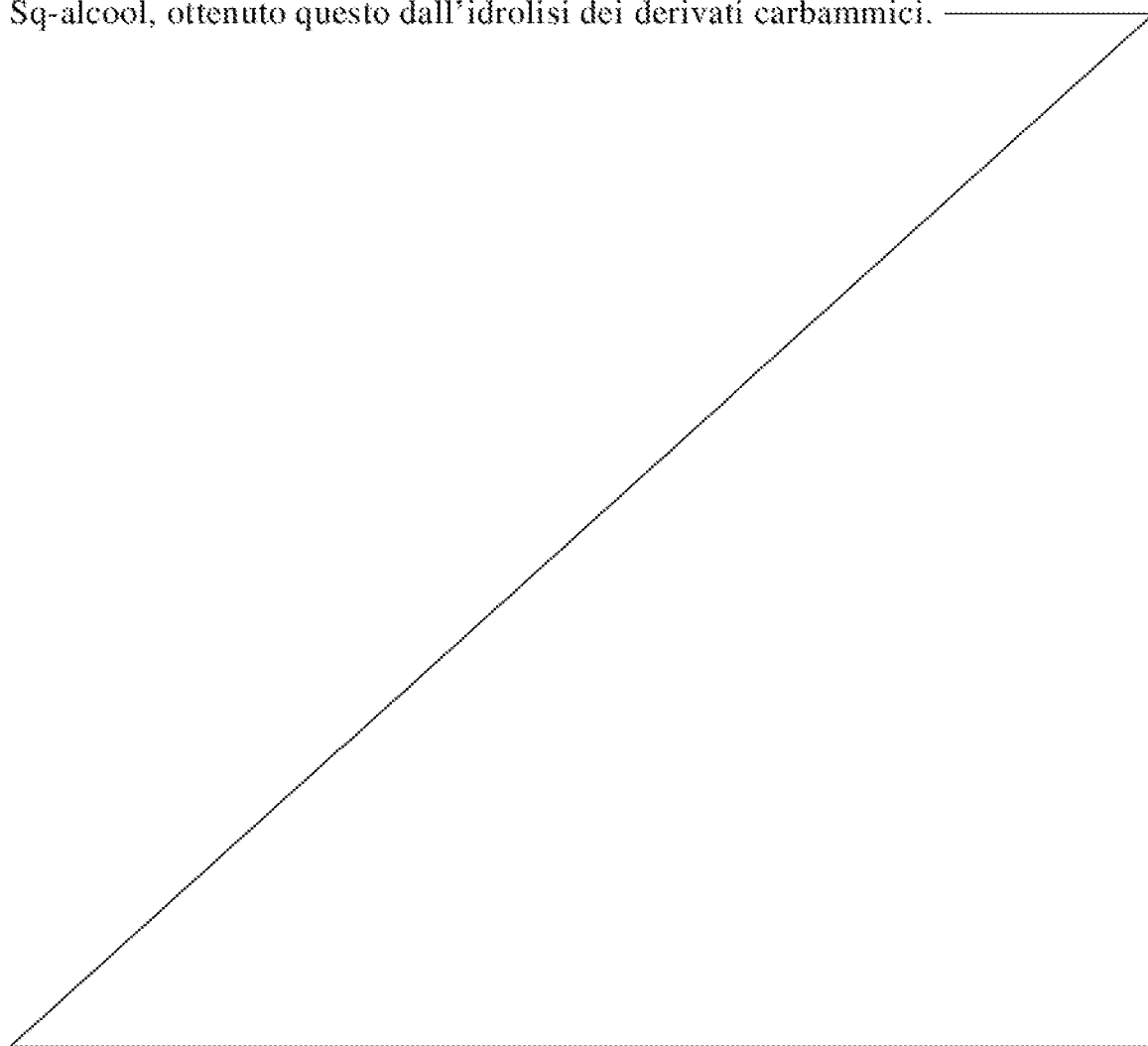
L'attività emolitica dei derivati squalenici di ARA-C è stata valutata anche con due profarmaci in forma di nanoparticelle. In questa forma Sq-ARA-C ammido ha mostrato un'attività emolitica superiore a quella di Sq-ARA-C carbammato a livello della concentrazione più alta (Fig. 2).

Per quanto riguarda il potere emolitico di Sq-GEM carbammato rispetto a Sq-GEM ammido e GEM, anche in questo caso il farmaco nella forma nativa (GEM) è risultato praticamente privo di attività emolitica e lo Sq-GEM ammido ha mostrato un'attività emolitica significativamente maggiore di quella di Sq-

GEM carbammato (Fig. 3).

Per approfondire ulteriormente le differenze osservate tra derivati ammidici e carbammati sull'attività emolitica, abbiamo valutato anche l'attività emolitica di Sq-alcool e Sq-acido, rispettivamente prodotti dall'idrolisi dei derivati squalenici carbammati e ammidi. Il confronto statistico ha messo in evidenza un'attività emolitica significativamente maggiore per lo Sq-acido già a livello della concentrazione più bassa (Fig. 4).

L'effetto emolitico complessivamente maggiore per i derivati ammidici di ARA-C e GEM è probabilmente da attribuire allo Sq-acido che si produce in seguito alla loro idrolisi. Sq-acido è risultato infatti molto più emolitico di Sq-alcool, ottenuto questo dall'idrolisi dei derivati carbammici.



Bibliografia

1. Ishida T., Akashi K., Yoshida K., Akiyama M., Sakurai Y., Tsukagoshi S. N⁴-acylarabinonucleosides. Brevetto US 3 991 045 (9.11.1976).
2. Nishimura D., Sugawara T., Emoto N. Novel Nucleoside Derivatives. Brevetto EP 0 0044 085 A1 (20.01.1982).
3. Arasaki M., Ishitsuka H., Kuruma I., Miwa M., Murasaki C., Shimma N., Umeda I. N-oxycarbonyl substituted 5'-deoxy-5-fluorocytidines. Brevetto EP 0 602 454 A1 (22.06.1994).
4. Bautista R., Ravaschino E., Elhalem E. Method for the preparation of Capecitabine and intermediates used in said method. Brevetto EP 2 241 556 A1 (22.10.2010).
5. Hoshi A., Castañer J. Capecitabine. *Drugs of the Future* **21**, 358-360 (1996).
6. Brinkman H.R., Kalaritis P., Morrissey J.F. Process for producing N4-acyl-5'-deoxy-5-fluorocytidine derivatives. Brevetto US 5,476,932 (19.12.1995).
7. Shimma N., Umeda I., Arasaki M., Murasaki C., Masubuchi K., Kohchi Y., Miwa M., Ura M., Sawada N., Tahara H., Kuruma I., Horii I., Ishitsuka H. The design and synthesis of a new tumor-selective fluoropyrimidine carbamate, capecitabine. *Bioorg. Med. Chem.* **8**, 1697-1706 (2000).
8. Drummond C.J., Sagnella S.M., Moghaddam M.J., Gong X. Amphiphile Prodrugs, Brevetto WO 2010/063080 A1 (10.06.2010).
9. Ghosh A.K., Brindisi M. Organic carbamates in drug design and medicinal chemistry. *J. Med. Chem.* **58**, 2895-2940 (2015).
10. Jacobson R.A. Carbamic esters from urea. *J. Am. Chem. Soc.* **60**, 1742-1744 (1938).

11. Argabright P.A., Rider H.D., Sieck R. Reaction of inorganic cyanates with organic halides. I. Direct synthesis of urethans. *J. Org. Chem.* **30**, 3317-3321 (1965).
12. Acott B., Beckwith A.L.J., Hassanali A., Redmond J.W. Reaction of lead tetra-acetate with primary amides. Formation of alkyl carbamates. *Tetrahedron Lett.* 4039-4045 (1965).
13. La Monica G., Monti C., Cenini S. The selective catalytic carbonylation of aromatic azides using homogeneous and polymer bound rhodium(I) complexes. *J. Mol. Catal.* **18**, 93-98 (1983).
14. Porta F., Cenini S., Pizzotti M., Crotti C. Reactions of diethyl carbonate with amines catalyzed by metal centres. *Gazz. Chim. Ital.* **115**, 275-277 (1985).
15. Cenini S., Crotti C., Pizzotti M., Porta F. Ruthenium carbonyl catalyzed reductive carbonylation of aromatic nitro compounds. A selective route to carbamates. *J. Org. Chem.* **53**, 1243-1250 (1988).
16. Angeles E., Santillán A., Martínez I., Ramirez A., Moreno E., Salmón M., Martínez R. A simple method for the synthesis of carbamates. *Synth. Commun.* **24**, 2441-2447 (1994).
17. Patonay T., Hegedüs L., Mogyoródi F., Zolnai L. α -Haloalkyl haloformates and related compounds 2. Synthesis of dichloromethyl carbonates and their transformation to carbamates. *Synth. Commun.* **24**, 2507-2513 (1994).
18. Hoskovec M., Hovorka O., Kalinová B., Koutek B., Streinz L., Svatoš A., Šebek P., Šaman D., Vrkoč J. New mimics of the acetate function in pheromone-based attraction. *Bioorg. Med. Chem.* **4**, 479-488 (1996).
19. Patonay T., Patonay-Pély E., Zolnai L., Mogyoródi F. α -Haloalkyl haloformates and related compounds 3. A facile synthesis of symmetrical and

unsymmetrical ureas via chloromethyl carbamates. *Synth. Commun.* **26**, 4253-4265 (1996).

20. Burk M.J., Allen J.G. A mild amide to carbamate transformation. *J. Org. Chem.* **62**, 7054-7057 (1997).

21. Yadav J.S., Reddy G.S., Reddy M.M., Meshram H.M. Zinc Promoted simple and convenient synthesis of carbamates: an easy access for amino group protection. *Tetrahedron Lett.* **39**, 3259-3262 (1998).

22. Myhren F., Børetzen B., Dalen A., Sandvold M. Gemcitabine derivatives. Brevetto WO 98/32762 (30.07.1998).

23. Peters G.J., Voorn D.A., Kuiper C.M., van der Wilt C.L., Noordhuis P., Smid K., Myhren F., Sandvold M., Hendriks H.R. Cell specific cytotoxicity and structure-activity relationship of lipophilic 1- β -D-Arabinofuranosylecytosine (Ara-C) derivatives. *Nucleosides & Nucleotides* **18**, 877-8 (1999).

24. Bergman A.M., Kuiper C.M., Myhren F., Sandvold M.L., Hendriks H.R., Peters G.J. Antiproliferative activity and mechanism of action of fatty acid derivatives of Arabinofuranosylecytosine (Ara-C) in leukemia and solid tumor cell lines. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* **23**, 1523-1526 (2004).

25. Bergman A.M., Kuiper C.M., Voorn D.A., Comijn E., Myhren F., Sandvold M.L., Hendriks H.R., Peters G.J. Antiproliferative activity and mechanism of action of fatty acid derivatives of arabinofuranosylecytosine in leukemia and solid tumor cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 503-11 (2004).

26. Clavis Pharma Ltd. Sito Web: www.clavispharma.com/Technology.

27. Burke A.C., Giles F.J. Elacytarabine – lipid vector technology overcoming drug resistance in acute myeloid leukemia. *Expert Opinion Investig. Drugs* **20**, 1707-1715 (2011).

28. Burke A., Swords R., Kelly K., Giles F.J. Elacytarabine. Antimetabolite, oncolytic. *Drugs of the Future* **34**, 941-49 (2009).
29. Dueland S., Aamdal S., Lind M.J., Thomas H., Sandvold M.L., Gaullier J-M., Rasch W. Intravenous administration of CP-4055 (ELACYT™) in patients with solid tumours. A phase I study. *Acta Oncol.* **48**, 137-145 (2009).
30. Rizzieri D., Krug U., Schlenk R.F., Vey N., Thomas X.G., Huguet F., Johansen M., Jacobsen T.F. A phase II study of elacytarabine plus idarubicin as second course remission-induction therapy in patients with acute myeloid leukemia. *J. Clin. Oncol.* **29** (suppl) ASCO Meeting abstracts TPS207 (2011).
31. Rizzieri D., Vey N., Gobbi M., Selleslag D.L.D., Dennis M.W., Kuliczowski K., Krug U., Moscardo F., Bron D., Moicean A.D., Venditti A., Jacobsen T.F., Foss O., Giles F.J. A randomized phase III study of elacytarabine versus limited investigator's choice in patients with refractory acute myeloid leukemia (AML). *J. Clin. Oncol.* **29** (suppl) ASCO Meeting abstracts TPS206 (2011).
32. Galmarini C.M., Myhren F., Sandvold M.L. CP-4055 and CP-4126 are active in ara-c and gemcitabine-resistant lymphoma cell lines. *Brit. J. Haematol.* **144**, 263-275 (2008).
33. Immordino M.L., Brusa P., Rocco F., Arpicco S., Ceruti M., Cattel L. Preparation, characterization, cytotoxicity and pharmacokinetics of liposomes containing lipophilic gemcitabine prodrugs. *J. Control. Release* **100**, 331-346 (2004).
34. Castelli F., Sarpietro M.G., Ceruti M., Rocco F., Cattel L. Characterization of lipophilic gemcitabine prodrug-liposomal membrane interaction by differential scanning calorimetry. *Mol. Pharmaceut.* **3**, 737-744

(2006).

35. Castelli F., Sarpietro M.G., Rocco F., Ceruti M., Cattel L. Interaction of lipophilic gemcitabine prodrugs with biomembrane models studied by Langmuir-Blodgett technique. *J. Colloid. Interf. Sci.* **313**, 363-368 (2007).
36. Stella B., Rocco F., Rosilio V., Renoir J.-M., Cattel L., Couvreur P. Nanoparticles of Gemcitabine derivatives. Brevetto francese depositato il 6/6/2004, n° 04 51365 e Stella B., Cattel L., Rocco F., Couvreur P., Renoir J.M., Rosilio V. Gemcitabine derivatives nanoparticles. Brevetto WO/2006/090029 (31/08/2006).
37. Couvreur P., Stella B., Reddy L.H., Hillaireau H., Dubernet C., Desmaële D., Lepetre-Mouelhi S., Rocco F., Dereuddre-Bosquet L., Clayette P., Rosilio V., Marsaud V., Renoir J.-M., Cattel L. Squalenoyl nanomedicines as potential therapeutics. *Nano Lett.* **6**, 2544-2548 (2006).
38. Reddy L.H., Renoir J.-M., Marsaud V., Lepetre-Mouelhi S., Desmaële D., Couvreur P. Anticancer efficacy of squalenoyl gemcitabine nanomedicine on 60 human tumor cell panel and on experimental tumor. *Mol. Pharmaceut.* **6**, 1526-1535 (2009).
39. Reddy L.H., Ferreira H., Dubernet C., Lepetre Mouelhi S., Desmaële D., Rousseau B., Couvreur P. Squalenoyl nanomedicine of gemcitabine is more potent after oral administration in leukemia-bearing rats: study of mechanisms. *Anti-Cancer Drugs* **19**, 999-1006 (2008).
40. Desmaële D., Gref R., Couvreur P. Squalenoylation: a generic platform for nanoparticulate drug delivery. *J. Control. Release* **161**, 609-618 (2012).
41. Ceruti M., Balliano G., Viola F., Cattel L., Gerst N., Schuber F. Synthesis and biological activity of azasqualenes, bis-azasqualenes and derivatives. *Eur.*

J. Med. Chem. **22**, 199-208 (1987).

42. Ceruti M., Rocco F., Viola F., Balliano G., Milla P., Arpicco S., Cattel L. 29-Methylidene-2,3-oxidosqualene derivatives as stereospecific mechanism-based inhibitors of liver and yeast oxidosqualene cyclase. *J. Med. Chem.* **41**, 540-554 (1998).

43. Cattel L., Ceruti M. Inhibitors of 2,3-oxidosqualene cyclase as tools for studying the mechanism and function of the enzyme. *Crit. Rev. Biochem. Mol.* **33**, 353-373 (1998).

44. Ceruti M., Viola F., Balliano G., Milla P., Roma G., Grossi G., Rocco F. Synthesis of (*E*)- and (*Z*)-29-methylidyne-2,3-oxidosqualene derivatives as inhibitors of liver and yeast oxidosqualene cyclase. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I*, 1477-1486 (2002).

45. Sen S.E., Prestwich G.D. Trisnorsqualene alcohol, a potent inhibitor of vertebrate squalene epoxidase. *J. Am. Chem. Soc.* **111**, 1508-10 (1989).

46. Ceruti M., Grosa G., Rocco F., Dosio F., Cattel L. A convenient synthesis of [3-³H]squalene and [3-³H]-2,3-oxidosqualene. *J. Labelled Compd. Radiopharm.* **34**, 577-585 (1994).

47. Ceruti M., Balliano G., Rocco F., Lenhart A., Schulz G.E., Castelli F., Milla P. Synthesis and biological activity of new iodoacetamide derivatives on mutants of squalene-hopene cyclase. *Lipids* **40**, 729-735 (2005).

48. Pogliani L., Ceruti M., Ricchiardi G., Viterbo D. An NMR and molecular mechanics study of squalene and squalene derivatives. *Chem. Phys. Lipids* **70**, 21-34 (1994).

49. Pogliani L., Milanesio M., Ceruti M., Viterbo D. Conformational and dynamical study of squalene derivatives. --- III --- Azasqualenes and solvated

squalene. *Chem. Phys. Lipids* **103**, 81-93 (1999).

50. Ceruti M., Rocco F., Di Pietro M.E., Tocci E., De Luca G. Conformational features of 4-(*N*)-squalenoyl-gemcitabine in solution: a combined NMR and molecular dynamics investigation. *New J. Chem.* **39**, 3484-3496 (2015).

51. Castelli F., Sarpietro M.G., Micieli D., Stella B., Rocco F., Cattel L. Enhancement of gemcitabine affinity for biomembranes by conjugation with squalene: differential scanning calorimetry and Langmuir-Blodgett studies using biomembrane models. *J. Colloid. Interf. Sci.* **316**, 43-52 (2007).

52. Cosco D., Rocco F., Ceruti M., Vono M., Fresta M., Paolino D. Self-assembled squalenoyl-cytarabine nanostructures as a potent nanomedicine for treatment of leukemic diseases. *Int. J. Nanomed.* **7**, 2535-2546 (2012).

53. Fessi H., Puisieux F., Devissaguet J. Ph., Ammoury N., Benita S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. *Int. J. Pharm.* **55** (1), R1-R4 (1989).

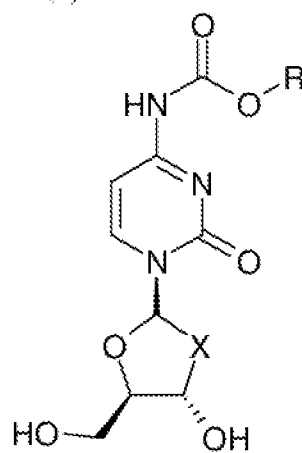
54. Alley M.C., Scudiero D.A., Monks A., Hursey M.L., Czerwinski M.J., Fine D.L., Abbott B.J., Mayo J.G., Shoemaker R.H., Boyd M.R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* **48**, 589-601, (1988).

55. Tørfoss V., Ausbacher D., Cavalcanti-Jacobsen C de A., Hansen T., Brandsdal B.-O., Havelkova M., Strøm M.B. Synthesis of anticancer heptapeptides containing a unique lipophilic $\beta^{2,2}$ -amino acid building block. *J. Pept. Sci.* **18**, 170-176 (2012).

56. Jeswani G., Alexander A., Saraf. Sh., Saraf. Sw., Qureshi A., Ajazuddin. Recent approaches for reducing hemolytic activity of chemotherapeutic agents. *J. Control. Release* **211**, 10-21 (2015).

RIVENDICAZIONI

1. Un composto di formula (I)



in cui:

R è una catena alchenilica o alchinilica, lineare o ramificata avente da 6 a 32 atomi di carbonio e contenente da 1 a 6 doppi e/o tripli legami;

X è un radicale bivalente scelto tra CHOH o CF₂.

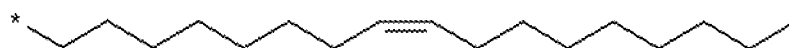
2. Un composto secondo la rivendicazione 1 in cui R è una catena alchenilica avente da 10 a 32 atomi di carbonio e contenente da 1 a 6 doppi legami.

3. Un composto secondo la rivendicazione 2, in cui R è una catena alchenilica lineare avente da 14 a 20 atomi di carbonio e contenente 1, 2 o 3 doppi legami, più preferibilmente una catena alchenilica lineare avente da 16 a 18 atomi di carbonio e contenente 1 o 2 doppi legami.

4. Un composto secondo la rivendicazione 3, in cui R è un residuo *cis*-9-ottadecen-1-il, *trans*-9-ottadecen-1-il, *cis*-9-eicosen-1-il, *trans*-9-eicosen-1-il, *cis*-11-eicosen-1-il, *trans*-11-eicosen-1-il, *cis*-13-eicosen-1-il, *trans*-13-eicosen-1-il o *cis*-9,12-ottadecadien-1-il.

5. Un composto secondo la rivendicazione 4 in cui R è un residuo *cis*-9-

ottadecen-1-il di formula (A)



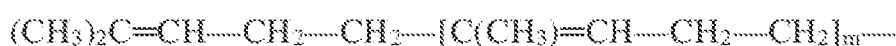
(A)

in cui l'asterisco * indica l'atomo di carbonio che si lega all'atomo di ossigeno del gruppo carbammato presente nei composti di formula (I).

6. Un composto secondo al rivendicazione 1, in cui R è rappresentato dal gruppo $R_1(CH_2)$ dove R_1 è una catena alchenilica ramificata avente da 9 a 31 atomi di carbonio, contenente da 1 a 6 doppi legami e da 1 a 6 ramificazioni.

7. Un composto secondo al rivendicazione 6, in cui i doppi legami presenti in R_1 possono, indipendentemente tra di loro, essere in configurazione *cis* o *trans* e le ramificazioni presenti in R_1 sono dei gruppi metilici.

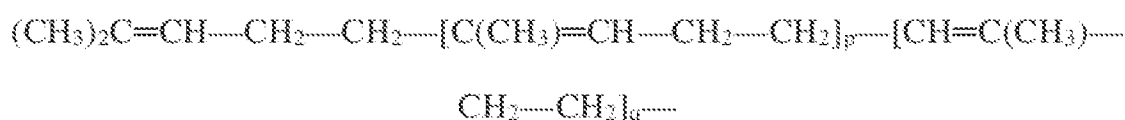
8. Un composto secondo le rivendicazioni 6 o 7 in cui R_1 è una catena alchenilica comprendente una o più unità isopreniche, scelto tra un residuo di formula (B):



(B)

dove m è un intero compreso tra 1 e 5,

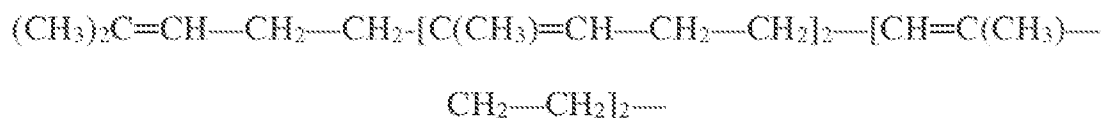
o un residuo di formula (C):



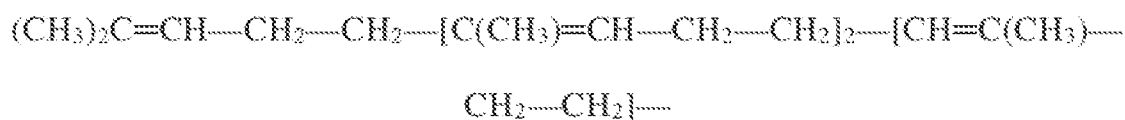
(C)

dove p è 1 o 2 e q è 0, 1 o 2.

9. Un composto secondo la rivendicazione 8 in cui R_1 è un residuo di formula (D), (E), o (F):



(D)

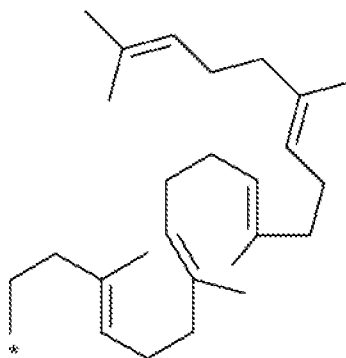


(E)



(F)

10. Un composto secondo le rivendicazioni da 6 a 9 in cui R è il residuo 1,1',2-*tris-nor*-squalenile di formula (G):

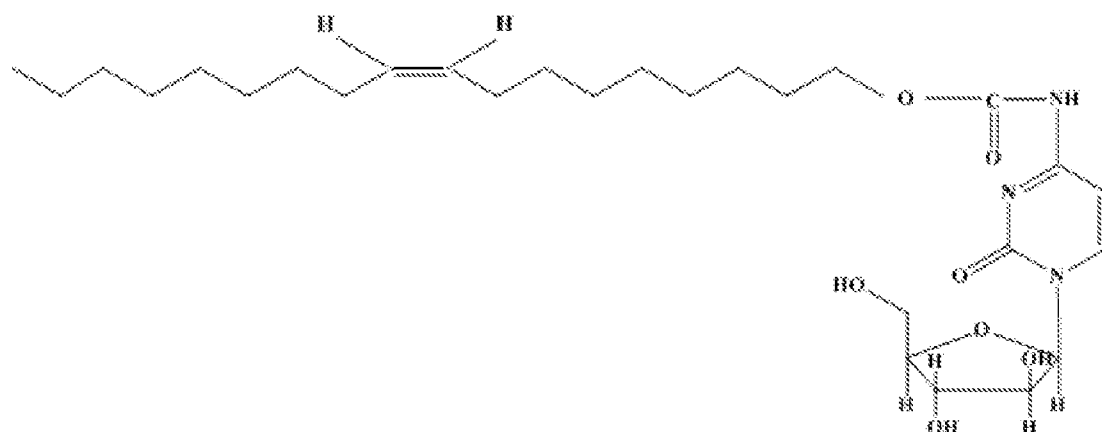


(G)

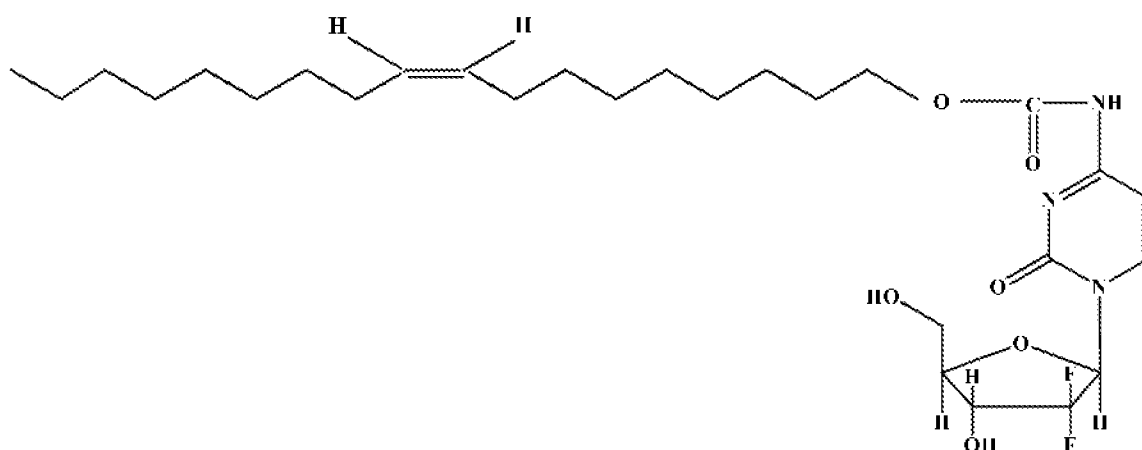
in cui l'asterisco * indica l'atomo di carbonio che si lega all'atomo di ossigeno del gruppo carbammato presente nei composti di formula (I).

11. Un composto secondo la rivendicazione 1, scelto tra:

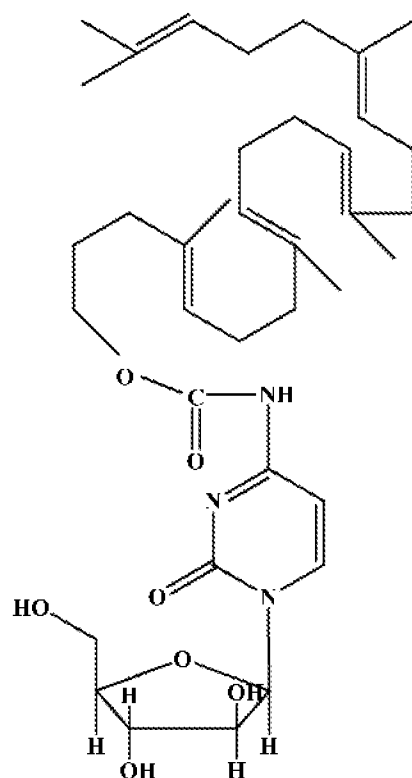
un composto di formula (I) in cui R è un residuo *cis*-9-ottadecen-1-il di formula (A), X è CHOH ed il composto di formula (I) è 4-[(*N*)-oleilossicarbonil]-1β-(arabinofuranosil)citosina di formula



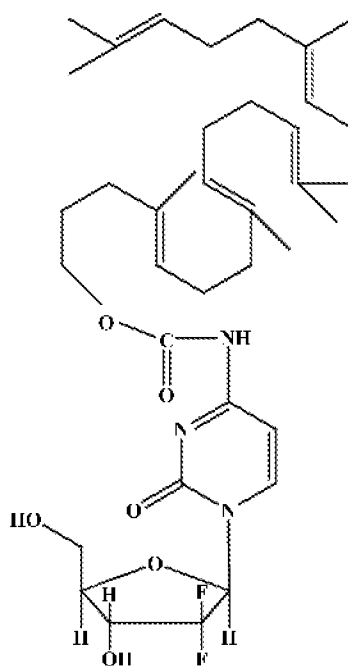
un composto di formula (I) in cui R è un residuo *cis*-9-ottadecen-1-il di formula (A), X è CF₂ ed il composto di formula (I) è 4-[(*N*)-oleilossicarbonil]gemcitabina di formula



un composto di formula (I) in cui R è il residuo 1,1',2-*tris-nor*-squalenile di formula (G), X è CHOH ed il composto di formula (I) è 4-[(*N*)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]-1β-(arabinofuranosil)citosina di formula



un composto di formula (I) in cui R è il residuo 1,1',2-*tris-nor*-squalenile di formula (G), X è CF₂ ed il composto di formula (I) è 4-[(*N*)-(1,1',2-*tris-nor*-squalenilossicarbonil)]gemcitabina di formula



12. Un composto secondo la rivendicazione 1, in cui R è un residuo 1,1',2-

tris-nor-squalenile di formula (G) come definito nella rivendicazione 10 in forma di nanoparticelle.

13. Un composto secondo una qualunque delle rivendicazioni precedenti per uso come farmaco.

14. Un composto secondo la rivendicazione 13 per uso nel trattamento di tumori.

15. Composizioni farmaceutiche contenenti un composto secondo le rivendicazioni da 1 a 12 ed almeno un eccipiente adatto all'impiego farmaceutico.

16. Procedimento per la preparazione di un composto di formula (I) come definito nella rivendicazione 1, comprendente i seguenti passaggi:

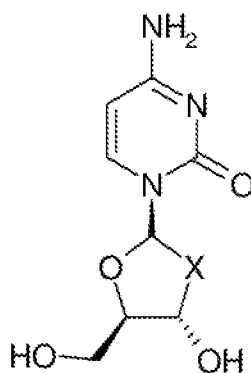
a) Reazione di un alogenoformiato di formula (II)



(II)

in cui R è come definito nella rivendicazione 1 e Y è scelto tra cloro e bromo, preferibilmente cloro, con polvere di zinco attivata mediante trattamento acido;

b) Aggiunta alla miscela di reazione ottenuta nel passaggio a) di un composto di formula (III)



(III)

in cui X è come definito per i composti di formula (I), per dare un composto di

formula (I);

c) Isolamento del composto di formula (I).

Milano, 22 dicembre 2015

Figura 1

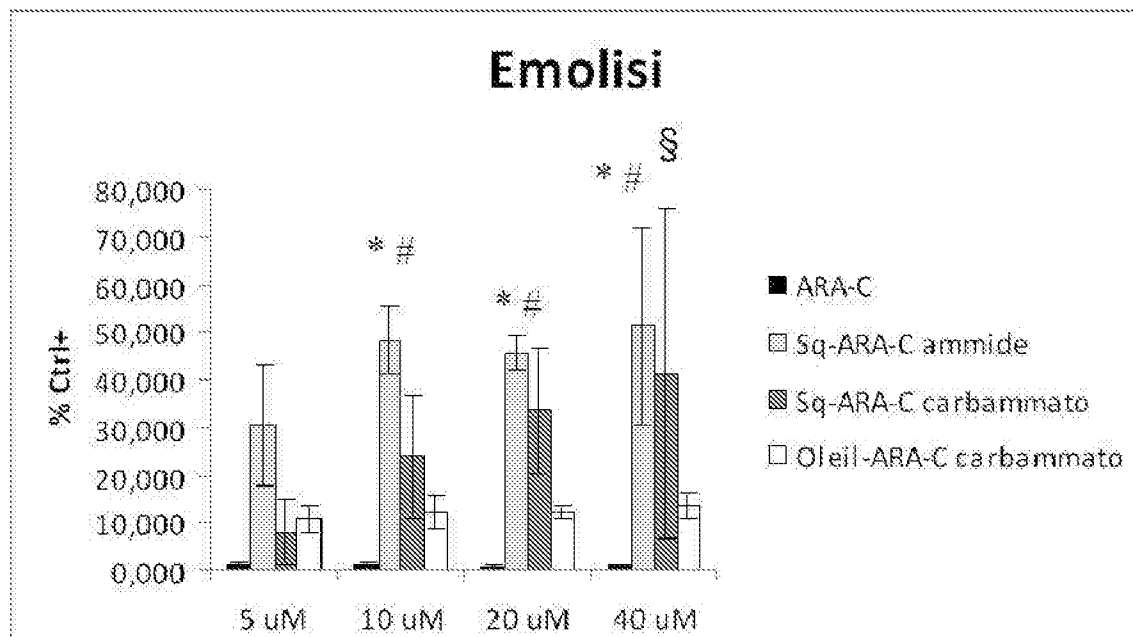


Figura 2

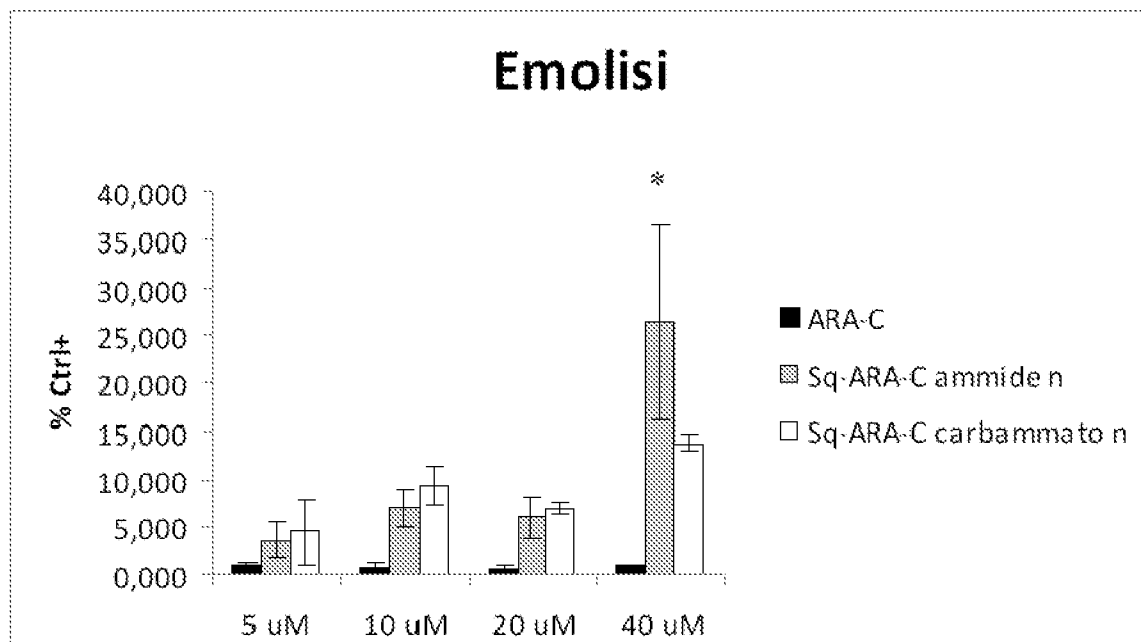


Figura 3

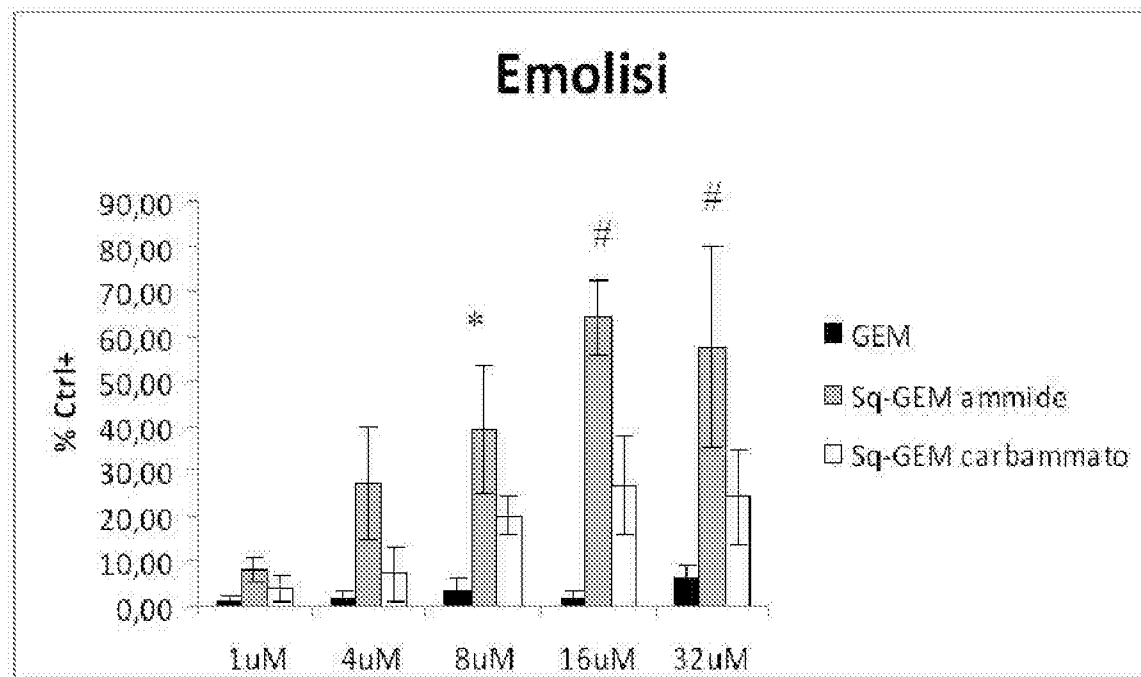


Figura 4

