

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN CHIMICA

E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA

SINTESI DI ANALOGHI ACETONILATI

DI INIBITORI DI CHINASI

RELATORE: CH.MO PROF. GIOVANNI MARZARO

CORRELATORE: DOTT.SSA MELANIA PORATTI

LAUREANDA: ALICE MARIAN

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

*« La vie n'est pas d'attendre que les orages passent,
c'est d'apprendre comment danser sous la pluie. »*

Lao Tseu

*Alla mia famiglia e gli amici più stretti.
Le mie guide.*

INDICE

1. RIASSUNTO	pag. 1
2. INTRODUZIONE	pag. 3
2.1. TARGETED THERAPY E PROTEINCHINASI	pag. 5
2.1.1. TIROSINCHINASI	pag. 6
2.1.1.1. Proteina Bcr-Abl	pag. 8
2.1.1.2. Strategie di inibizione delle tirosinchinasi	pag. 13
2.1.1.3. Imatinib	pag. 15
2.1.1.4. Ponatinib	pag. 20
2.1.2. CHINASI CICLINA DIPENDENTI	pag. 22
2.1.2.1. Strategie di inibizione delle CDK	pag. 27
2.1.2.2. Palbociclib	pag. 28
3. OBIETTIVO	pag. 33
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	pag. 35
4.1. SINTESI DI ACETONIL-IMATINIB	pag. 35
4.2. SINTESI DI ACETONIL-PONATINIB	pag. 38
4.3. SINTESI DI ACETONIL-PALBOCICLIB	pag. 41
5. MATERIALI E METODI	pag. 45
5.1. MATERIALI	pag. 45
5.2. STRUMENTAZIONE	pag. 45

5.3. METODI	pag. 46
5.3.1. SINTESI DI ACETONIL-IMATINIB	pag. 46
5.3.2. SINTESI DI ACETONIL-PONATINIB	pag. 54
5.3.3. SINTESI DI ACETONIL-PALBOCICLIB	pag. 66
6. BIBLIOGRAFIA	pag. 73

INDICE DEGLI SCHEMI

Schema 1. Sintesi di acetoniI Imatinib.	pag. 36
Schema 2. Sintesi di acetoniI Ponatinib.	pag. 40
Schema 3. Sintesi di acetoniI Palbociclib.	pag. 41

INDICE DELLE FIGURE

- Figura 1.** Rappresentazione schematica dell'attivazione di una NRTK. pag. 7
- Figura 2.** Rappresentazione schematica della formazione del cromosoma Philadelphia. pag. 8
- Figura 3.** Rappresentazione schematica della rottura dei geni ABL e BCR e corrispondenti catene di RNA. pag. 9
- Figura 4.** Schema sintetico delle principali zone di regolazione della proteina Abl e mancata regolazione della proteina chimerica Bcr-Abl. pag.10
- Figura 5.** Struttura cristallografica della proteina Bcr-Abl in conformazione attiva ed inattiva. pag. 11
- Figura 6.** Rappresentazione del meccanismo di fosforilazione dei substrati proteici da parte di Bcr-Abl e transitoria protonazione della D363. (R= peptide, K=lisina, E=glutammato, D=aspartato; S=serina). pag. 12
- Figura 7.** Schema d'interazione dell'ATP con il sito catalitico della proteina tirosinchinasi EGFR, rappresentativo del sito catalitico di tutte le chinasi. pag. 14
- Figura 8.** Ottimizzazione e funzioni dei gruppi chimici presenti nella struttura dell'Imatinib. pag. 17
- Figura 9.** Schema delle interazioni di Imatinib con diverse porzioni della tasca dell'ATP all'interno di Bcr-Abl. pag. 18
- Figura 10.** (a) Struttura della proteina Bcl-Abl nella conformazione inattiva (DFG-out), sono colorate le strutture che subiscono un cambiamento conformazionale. (b) Interazioni di Imatinib con la proteina Bcl-Abl (DFG-out). In verde sono evidenziate le mutazioni puntiformi con un meccanismo conosciuto e in rosso quelle con un meccanismo sconosciuto. pag. 19
- Figura 11.** Modalità d'interazione di Ponatinib con la struttura nativa della proteina Bcr-Abl o quella mutata T315I. pag. 21

- Figura 12.** Struttura cristallografica del complesso di CDK4/ciclina D, in azzurro la CDK4 e in arancio la ciclina D. pag. 23
- Figura 13.** Schema rappresentativo delle varie fasi del ciclo cellulare con i corrispondenti complessi CDK/ciclina. pag. 24
- Figura 14.** Strutture chimiche di Flavopiridolo, Dinaciclib e Palbociclib. pag. 28
- Figura 15.** Analisi strutturale del Palbociclib. pag. 30
- Figura 16.** Rappresentazione schematica del sito catalitico della CDK6; (a) Interazione del Palbociclib con CDK6 nella conformazione inattiva; (b) Interazione del ATP con CDK6 nella conformazione attiva. pag. 31
- Figura 17.** Rappresentazione schematica delle interazioni mediate dal Palbociclib nella CDK6. pag. 32
- Figura 18.** Struttura di Imatinib, Ponatinib e Palbociclib e i rispettivi analoghi acetoniati. pag. 34
- Figura 19.** (a) Schema di un liposoma con doppio strato fosfolipidico (verde) nel quale è inserito un linker idrofobico (arancione) e alla quale estremità è legato il farmaco (blu). (b) Rappresentazione di una nanoparticella d'oro sulla quale sono adsorbiti dei linker disolfuri alla quale estremità è legato il farmaco (blu). pag. 34
- Figura 20.** Meccanismo di clorurazione in presenza di DMF. pag. 37
- Figura 21.** Ciclo catalitico dell'accoppiamento di Sonogashira. pag. 38
- Figura 22.** Meccanismo della reazione di Heck. pag. 42

ABBREVIAZIONI

Abl	Proteina tirosinchinasi non recettoriale di Abelson
Ace-Ima	Acetonil Imatinib
Ace-Pal	Acetonil Palbociclib
Ace-Pon	Acetonil Ponatinib
ACN	Acetonitrile
Ac ₂ O	Anidride acetica
AcOH	Acido acetico
Bcr	Proteina non recettoriale della Breakpoint Cluster Region
ALL	leucemia linfoblastica acuta
CE	Cicloesano
CML	Leucemia mieloide cronica
DIPEA	<i>N,N</i> -diisopropiletilammina
DMAP	Dimetilamminopiridina
DMF	Dimetilformammide
DMF-DMA	Dimetilformammide dimetilacetale
DMSO	Dimetilsolfossido
DNA	Acido deossiribonucleico
EGFR	Recettore del fattore di crescita epidermico
EtOAc	Etilacetato

EtOH	Etanolo
FDA	Food and Drug Administration
IPrOH	Isopropanolo
max	Massimo
MeOH	Metanolo
MW	Microonde
NBS	<i>N</i> -bromosuccinimide
NMP	1-metil-2-pirrolidone
NMR	Risonanza magnetica nucleare
NRTK	Tirosinchinasi non recettoriali
OA	Addizione ossidativa
PDGFR	Recettore del fattore di crescita derivato dalle piastrine
PTK	Proteine tirosinchinasi
Pd(OAc) ₂	Palladio(II) acetato
Pd(PPh ₃) ₄	Tetrakis(trifenilfosfino)palladio (0)
Tamb	Temperatura ambiente
TEA	Trietilammina
TFA	Acido trifluoroacetico
THF	Tetraidrofurano
TK	Tirosinchinasi
TKI	Inibitori di tirosinchinasi

TM	Transmetallazione
RE	Eliminazione riduttiva
RTK	Tirosinchinasi recettoriali
VdW	Van der Waals
VEGF	Recettore del fattore di crescita endoteliale

1. RIASSUNTO

In questa tesi sono descritte le sintesi di analoghi di inibitori di chinasi noti, quali Imatinib, Ponatinib e Palbociclib.

In particolare, i composti oggetto di studio differiscono rispetto ai farmaci noti per la presenza di una funzione acetilica nella porzione esposta al solvente, in modo da non modificare l'interazione con il bersaglio. Tale modifica è stata apportata al fine di permettere una futura coniugazione, mediante formazione di un legame idrazonico pH-sensibile, con catene lipofile al fine di consentire il caricamento degli inibitori chinasici all'interno di liposomi o di consentire la decorazione di nanoparticelle d'oro.

Per la preparazione dei composti progettati sono state seguite le strategie di sintesi messe a punto nel laboratorio di ricerca presso cui la tesi è stata svolta.

Tutte le molecole finali sono state caratterizzate mediante spettrometria di risonanza magnetica nucleare del protone.

2. INTRODUZIONE

Con il termine cancro si definisce un ampio gruppo di malattie eterogenee, tutte caratterizzate da una crescita incontrollata di cellule anomale.

L'organizzazione Mondiale della sanità stima che il cancro sia la seconda causa di morte a livello globale dopo le patologie cardiovascolari, con 9.6 milioni di morti nel corso del 2018.¹

Uno sviluppo tumorale è un processo multifasico che nasce innanzitutto da un danno genetico non letale dovuto a errori nella duplicazione del DNA che possono essere sia casuali che indotti da fattori chimici, fisici o biologici. Dall'espansione clonale di una singola cellula mutata si va incontro ad ulteriori mutazioni. Tuttavia, non tutti i geni mutati portano ad uno sviluppo tumorale; esistono infatti quattro classi principali di geni che se mutati portano a cancerogenesi:

- protooncogeni, che codificano per proteine implicate nei processi di crescita e di differenziamento cellulare, da cui derivano per mutazioni gli oncogeni;
- geni oncosoppressori, che codificano per proteine che impediscono una crescita cellulare incontrollata;
- geni che controllano i sistemi di riparazione del DNA;
- geni che sono implicati nella regolazione dell'apoptosi.

L'attivazione anomala di protooncogeni e/o l'inattivazione di geni oncosoppressori o l'alterazione dei sistemi di riparazioni del DNA o dell'apoptosi fanno sì che possa crescere un tumore.²

Non tutte le cellule dell'organismo sono suscettibili alla trasformazione tumorale, in quanto questa è correlata alla velocità di proliferazione: una cellula differenziata appartenente ad un tessuto a lento o nullo ricambio cellulare, come nel caso dei miociti cardiaci o dei neuroni, difficilmente potrà evolvere in cellula tumorale. Sono quindi le cellule in continuo sviluppo e rapida divisione, come ad esempio le cellule epiteliali o del sistema ematopoietico ad essere più soggette a fenomeni di cancerogenesi.³

Fino a qualche decennio fa, i principali approcci farmacologici antitumorali erano metodi aspecifici. La maggior parte dei farmaci chemioterapici, infatti, erano indirizzati verso le cellule in rapida proliferazione colpendo indistintamente sia le cellule sane che quelle tumorali. Con questo tipo di approccio non selettivo si andava incontro a notevoli effetti collaterali, tra cui danni ai tessuti sani e l'inibizione dei processi fisiologici quali rigenerazione e ricambio tissutale.⁴

Negli ultimi anni la ricerca è stata rivolta sempre di più verso lo studio di proteine, recettori e *pathway* biochimici specifici per le cellule tumorali, in modo da poter progettare farmaci che colpiscano selettivamente lo sviluppo delle cellule tumorali senza danneggiare i tessuti sani e i processi fisiologici. Questa innovativa strategia antitumorale prende il nome di *targeted therapy*.⁵ Dato il loro specifico coinvolgimento nell'eziologia della patologia tumorale, fra i bersagli di elezione si annoverano le tirosinchinasi (TK) e le chinasi ciclina dipendenti (CDK).

Oltre alla progettazione di molecole selettive verso specifici target biomolecolari, grande attenzione è stata rivolta nei confronti dei *drug delivery systems*, al fine di consentire un miglior indirizzamento del farmaco verso il tessuto o organo bersaglio. Questi sistemi, come ad esempio liposomi o nanoparticelle d'oro, hanno anche lo scopo di poter migliorare diversi aspetti:

- le proprietà chimico-fisiche del farmaco come la solubilità e la stabilità nell'organismo;
- il profilo farmacocinetico;
- l'indice terapeutico;
- la *compliance* del paziente.⁶

La combinazione di un farmaco selettivo per uno specifico bersaglio tumorale con un sistema di direzionamento e protezione si possono ottenere terapie ancor più efficaci e mirate, con una netta riduzione degli effetti *off-target*.

2.1. TARGETED THERAPY E PROTEINCHINASI

Lo sviluppo dei farmaci per la *targeted therapy* richiede anzitutto l'identificazione di bersagli specifici indispensabili alla crescita e sopravvivenza delle cellule tumorali.

Un primo approccio consiste nel confrontare le proteine presenti nelle cellule tumorali e sane, per trovare quali sono esclusivamente presenti nelle cellule tumorali o quali sono presenti in largo eccesso, in particolare nel caso di proteine coinvolte nella replicazione e sopravvivenza cellulare.

Un altro approccio è quello di identificare proteine mutate che influenzano la crescita tumorale oppure anomalie cromosomiali che sono presenti nelle cellule tumorali ma non in quelle sane.

Una volta identificato il bersaglio da colpire, possono essere sviluppati farmaci che interagiscano con esso in modo da interferire negativamente con la crescita e la sopravvivenza delle cellule tumorali.

Nelle patologie tumorali è stato dimostrato che le proteinchinasi giocano un ruolo fondamentale perché coinvolte nei processi cellulari di differenziamento, replicazione, metabolismo, sopravvivenza e apoptosi. Per questa ragione esse sono diventate un bersaglio molto interessante in ambito farmaceutico.⁷

Le chinasi hanno il ruolo di trasferire un gruppo fosfato in posizione γ dell'ATP (o del GTP) ad un amminoacido di una proteina bersaglio, modulandone così la sua attività. Quando una proteinchinasi viene fosforilata si osserva un cambiamento conformazionale, si passa da una conformazione inattiva ad una attiva in grado di fosforilare un'altra chinasi che a sua volta fosforila altre proteine portando in questo modo ad un'amplificazione del segnale tramite un processo a cascata.⁸

Esistono 518 geni che codificano per proteinchinasi e si suppone che 218 di questi geni, se deregolati, siano collegati all'insorgenza di patologie. Le proteinchinasi possono essere classificate, in funzione della natura dell'amminoacido che viene fosforilato in:

- Tirosinchinasi (TK), che vanno a fosforilare il gruppo fenolico di residui tirosinici;
- Serina/treonina chinasi, che fosforilano il gruppo alcolico di residui di serina o treonina.⁹

2.1.1. TIROSINCHINASI

Dall'analisi genomica è stato riscontrato che 90 geni codificano per TK tra cui 58 per TK di membrane o *Receptor Tyrosine Kinase* (RTK, come EGFR, PDGFR, VEGFR) e 32 per TK citoplasmatiche o *Non Receptor Tyrosine Kinase* (NRTK, come la famiglia di chinasi Scr, Abl).¹⁰

Le RTK sono proteine transmembrana che svolgono contemporaneamente funzioni recettoriali ed enzimatiche. La loro struttura è costituita da un dominio extracellulare deputato al *binding* del ligando, un dominio transmembrana e un dominio intracellulare contenente il sito catalitico per il trasferimento del gruppo fosfato dall'ATP al substrato.¹¹ L'interazione di un ligando con il dominio extracellulare ammino-terminale provoca l'oligomerizzazione delle RTK e la successiva autofosforilazione dei residui tirosinici posti nel dominio intracellulare. Questo implica un cambiamento conformazionale da una conformazione inattiva, nella quale il sito catalitico viene bloccato dal *loop* di attivazione, ad una conformazione attiva, in cui il sito catalitico ne viene liberato.¹² La conseguenza è l'inizio di una cascata di segnale in cui sono poi coinvolte anche le NRTK.¹³

Le NRTK sono localizzate soprattutto nel citoplasma, nel nucleo e alcune interagiscono con la superficie interna di membrane plasmatiche mediante ancore lipidiche (residui di acido miristico o palmitico). Queste proteine possono avere una notevole variabilità strutturale: il dominio catalitico contenete la tasca per il legame con l'ATP e i substrati da fosforilare è presente in tutte, mentre variano i domini

che svolgono ruoli nell'attivazione della proteina, e quelli che mediano l'interazione proteina-proteina, proteina-lipide, proteina-DNA che determinano la localizzazione subcellulare e la funzione della proteina. I più diffusi domini regolatori sono SH2 e SH3 (SRC Homology).¹⁴

In seguito all'attivazione della NRTK, ad esempio tramite l'interazione con una RTK attivata, si va incontro a defosforilazione di un residuo tirosinico che destabilizza la struttura cosicché si ottiene un cambiamento conformazionale che rende i domini catalitici accessibili per successive fosforilazioni (Figura 1). Tramite questo meccanismo articolato si consente l'amplificazione del segnale a livello intracellulare.¹⁵

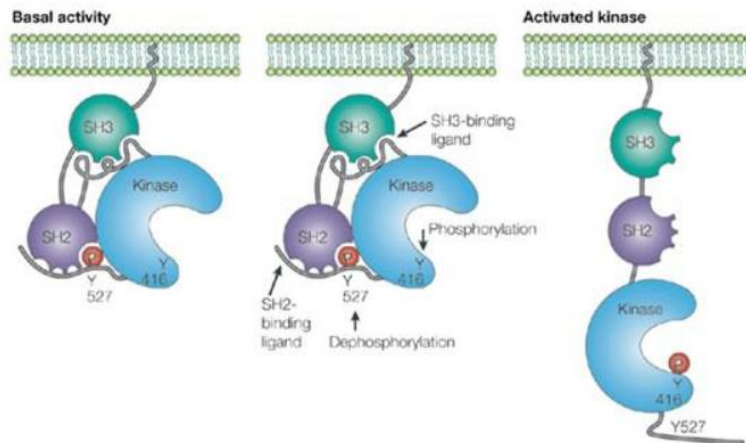


Figura 1. Rappresentazione schematica dell'attivazione di una NRTK.

Molte TK sono deregolate e sovraesprese nelle cellule tumorali e per questo costituiscono un *target* ideale per gli inibitori selettivi. I meccanismi più frequenti del mal funzionamento di queste chinasi sono:

- oligomerizzazione costitutiva delle TK in assenza del legame con il ligando o in assenza di segnali attivatori fisiologici, con conseguente autofosforilazione e attivazione perenne;
- mutazioni a carico delle TK che interrompono il loro meccanismo di autoregolazione, in particolare rendendole costantemente attive o aumentando la sensibilità del recettore al suo ligando;
- aumentata o anomala espressione delle TK, del ligando o di entrambi;
- diminuzione dei fattori inibitori delle TK.

Un'attivazione aberrante delle TK può aumentare la sopravvivenza, la proliferazione e la resistenza ai farmaci citotossici delle cellule tumorali; inoltre aumenta l'angiogenesi, l'invasività e il potenziale metastatico del tumore.¹⁶

2.1.1.1. PROTEINA Bcr-Abl

Bcr-Abl è una NRTK di fusione che deriva dalla traslocazione del gene di Abelson (ABL) presente sul cromosoma 9 alla *Breakpoint Cluster Region* (BCR) del cromosoma 22 (Figura 2).

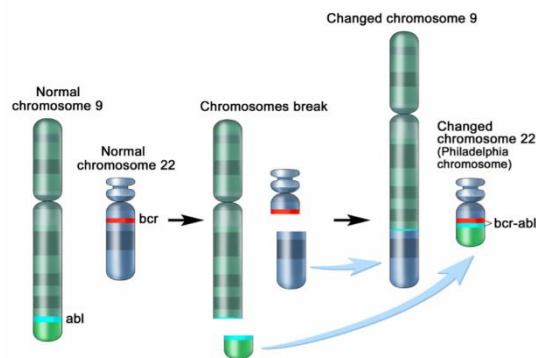


Figura 2. Rappresentazione schematica della formazione del cromosoma Philadelphia.

Questo cromosoma modificato fu identificato da due ricercatori americani, Peter Nowell e David Hugerford e fu chiamato *Philadelphia chromosome* dal nome della città nella quale si trovavano i due scienziati.¹⁷

Il punto di rottura del gene ABL può avvenire a monte dell'esone 1b e contenere il residuo miristilico covalentemente legato al N-terminale, a valle dell'esone 1a e quindi avere la regione N-terminale libera o fra i due. Comunque sia questi esoni, anche se trascolati sul cromosoma Philadelphia, non vengono mai trascritti nella proteina di fusione Bcr-Abl.

Il gene BCR può rompersi principalmente in due diverse posizioni (Figura 3) e formare due differenti oncogeni BCR-ABL; si avrà pertanto la sintesi di due proteine di dimensioni diverse, p190 e p210; p190 viene espressa maggiormente nella leucemia linfoblastica acuta (ALL) e p210 è predominante nella leucemia mieloide cronica (CML).¹⁸

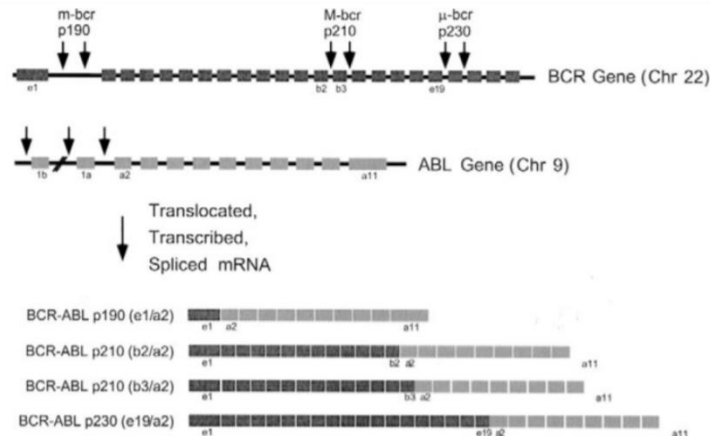


Figura 3. Rappresentazione schematica della rottura dei geni ABL e BCR e corrispondenti catene di RNA.

La proteina Bcr-Abl, che deriva dalla trascrizione del gene BCR-ABL, mantiene la capacità enzimatica tirosinchinasica conferita dal dominio SH1, ma perde il sistema di autocontrollo conferito dalla porzione N-terminale. Infatti, nella fusione della proteina, la parte N-terminale che ha la funzione di controllare l'attività tirosinchinasica viene sostituita dalla proteina Bcr. Quest'ultima, invece, possiede un dominio di oligomerizzazione, *coiled-coil*, che promuove la dimerizzazione dell'oncoproteina e la conseguente attivazione (Figura 4).¹⁹

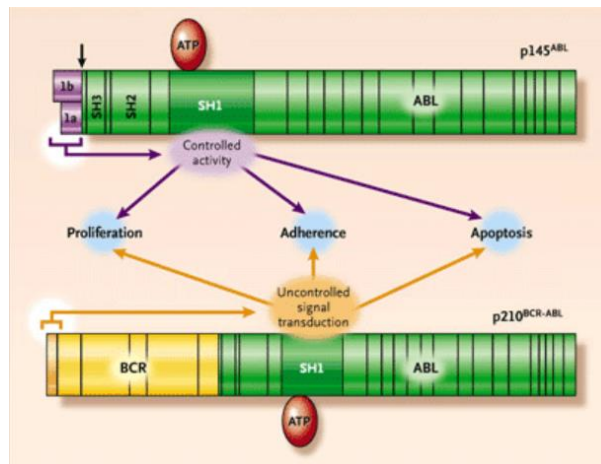


Figura 4. Schema sintetico delle principali zone di regolazione della proteina Abl e mancata regolazione della proteina chimerica Bcr-Abl.

A causa della mancata autoregolazione, la proteina Bcr-Abl risulta iperattiva e ne consegue una disregolazione delle vie di segnali intracellulari. Questo comporta:

- aumentata proliferazione cellulare;
- diminuzione dell'adesione alla matrice del midollo osseo;
- inibizione dell'apoptosi delle cellule ematopoietiche portando ad un notevole incremento del numero di cellule mieloidi;
- instabilità genomica.²⁰

Grazie all'analisi cristallografica della proteina Bcr-Abl (Figura 5), è stato possibile analizzare la struttura tridimensionale del dominio catalitico; si evidenziano due distinti lobi, uno diretto verso l'*N*-terminale composto principalmente da foglietti- β , e l'altro verso la porzione *C*-terminale formato prevalentemente da α -eliche.²¹

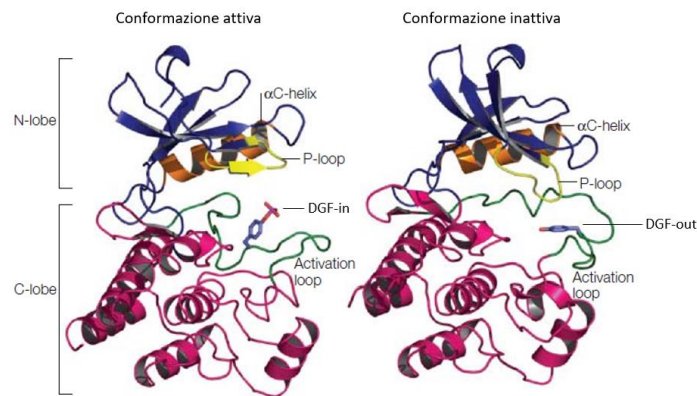


Figura 5. Struttura cristallografica della proteina Bcr-Abl in conformazione attiva ed inattiva.

Negli enzimi capaci di legare ATP e di trasferire un gruppo fosfato ad un substrato, esiste una regione altamente conservata, ovvero il *P-loop* (*Phosphate-binding loop*); esso connette due filamenti $\beta 1$ e $\beta 2$ del lobo-*N* per formare il tetto del sito attivo. Grazie alla sua grande flessibilità, un residuo del *P-loop* può intercalarsi tra il β e γ fosfato dell'ATP promuovendo la rottura del legame fosfoanidridico in seguito all'attacco nucleofilo del residuo aspartico (Asp363) del *loop* di attivazione. Quest'ultimo si trova nel lobo-*C* e grazie alla sua flessibilità provoca un cambiamento conformazionale della chinasi che passa da una conformazione inattiva ad una conformazione attiva. Più in dettaglio il *loop* di attivazione ha tre regioni chiavi: il dominio DFG (Asp-Phe-Gly), un residuo tirosinico (Tyr393) e la regione di legame per il substrato. Quando il residuo Tyr393 viene fosforilato si ottiene l'estensione del *loop* di attivazione e il conseguente cambiamento conformazionale, chiamato *DFG-in*, che attiva la proteina Bcr-Abl. Il dominio DFG si trova in due stati, in base alla conformazione attiva o inattiva della proteina: *DFG-in* è la forma cataliticamente attiva, in cui il residuo Phe si trova in una *back-pocket* idrofobica, e consente al residuo Asp381 di coordinare lo ione Mg^{2+} e l'entrata dell'ATP nel sito catalitico; *DFG-out* invece è la forma cataliticamente inattiva, in cui il residuo Phe si muove al di fuori della *back-pocket* e fa ruotare l'Asp381 che non è più in grado di coordinare lo ione Mg^{2+} e blocca l'ingresso all'ATP. I due lobi *N* e *C* sono collegati da una regione cerniera (*hinge region*) che partecipa al legame con l'ATP formando due ponti idrogeni. Nella tasca dell'ATP si trova un

residuo treoninico (Thr 315) chiamato *gatekeeper* che è di fondamentale importanza nella progettazione di inibitori di chinasi.^{21,22}

Come accennato precedentemente, il meccanismo di fosforilazione avviene grazie all'attacco nucleofilo del residuo aspartico (D363) sul gruppo ossidrilico del substrato proteico che in seguito attacca il γ -fosfato dell'ATP stabilizzato dallo ione Mg^{2+} . Nella stabilizzazione del complesso interviene anche il residuo amminico di una lisina. Il particolare di questo meccanismo d'azione è il transitorio stato di protonazione del D363 che promuove il cambiamento conformazionale che porta all'inattivazione dell'oncoproteina (Figura 6).

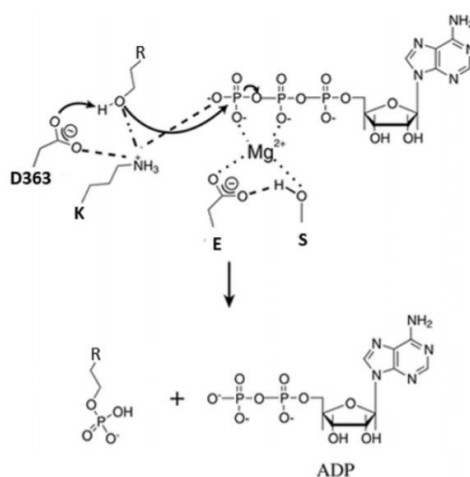


Figura 6. Rappresentazione del meccanismo di fosforilazione dei substrati proteici da parte di Bcr-Abl e transitoria protonazione della D363. (R=peptide, K=lisina, E=glutammato, D=aspartato; S=serina).

Quindi nelle patologie tumorali questa particolare proteina chimerica non risulta costitutivamente attiva ma è in uno stato di iperattività. Se la proteina fosse costitutivamente attiva senza mai tornare alla conformazione inattiva non si potrebbero sviluppare farmaci capaci di interagire con la forma inattiva.²²

2.1.1.2. Strategia di inibizione delle tirosinchinasi

Nel sito catalitico tutte le chinasi possiedono due regioni: una predisposta al legame con il cofattore per la fosforilazione, cioè l'ATP, e una adatta all'interazione con il substrato. Così, immaginare di sviluppare farmaci che vadano a bloccare il sito di interazione dell'ATP sembra impossibile a causa della mancata selettività tra le differenti proteinchinasi. Tuttavia, grazie alle strutture cristallografiche è stato dimostrato che esiste una significativa differenza tra la composizione amminoacidica del sito di *binding* dell'ATP nelle diverse chinasi, in quanto soltanto alcune parti rimangono altamente conservate (come ad esempio il domino DFG). Inoltre, è stato rilevato che l'ATP non occupa tutta la tasca d'interazione, in quanto rimangono degli spazi inoccupati. Di conseguenza è possibile sviluppare farmaci ATP mimetici selettivi per specifiche proteine tirosinchinasi.²³

Per permettere la progettazione di potenti e selettivi inibitori, è indispensabile conoscere lo schema d'interazione dell'ATP con il suo dominio catalitico (Figura 7):

- la base purinica è inserita in profondità nel sito attivo e media due importanti ponti idrogeni con amminoacidi presenti nella *hinge region* (regione che collega due lobi distinti del enzima);
- l'eterociclico forma interazioni di Van Der Waals con i residui presenti nelle vicinanze;
- il ribosio si inserisce in una tasca idrofilica nella quale tramite i suoi ossidrili può mediare ponti idrogeni con amminoacidi polari;
- la catena trifosfato si localizza lungo la regione che porta all'uscita della cavità catalitica (*Cleft*) e interagisce con ioni metallici e amminoacidi tramite ponti idrogeni.²³

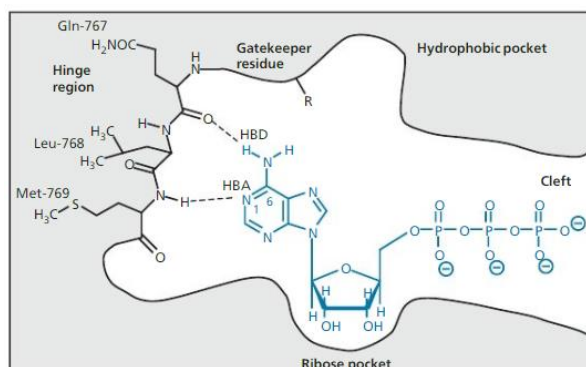


Figura 7. Schema d'interazione dell'ATP con il sito catalitico della proteina tirosinchinasi EGFR, rappresentativo del sito catalitico di tutte le chinasi.

Oltre a queste regioni di interazioni possiamo evidenziare delle regioni non occupate dall'ATP:

- la tasca idrofobica I (*hydrophobic pocket I*) che si localizza all'opposto della cavità del ribosio. All'entrata di questa tasca si trova il residuo amminoacido denominato *gatekeeper* fondamentale per differenziare le varie proteinchinasi. In alcune il residuo amminoacidico *gatekeeper* è ingombrante e blocca l'accesso alla tasca idrofobica, in altre è piccolo e permette di progettare inibitori che possano instaurare delle interazioni con la tasca idrofobica. Gli amminoacidi presenti in questa tasca differiscono da una proteinachinasi all'altra consentendo lo sviluppo di inibitori con selettività diversa;
- la tasca idrofobica II (*hydrophobic pocket II* o *hydrofobic back pocket*) si trova nelle vicinanze della prima tasca idrofobica ed è accessibile solo nella forma inattiva dell'enzima; è quindi possibile sviluppare inibitori che possano interagire con la conformazione inattiva dell'enzima. Questa tasca possiede una composizione amminoacidica molto variabile tra le proteinchinasi e permette di progettare inibitori ancor più selettivi.²³

Gli inibitori di TK si legano nel sito catalitico dell'enzima per prevenire l'interazione con l'ATP sono suddivisi in due classi: inibitori di tipo I, che si legano alla conformazione attiva dell'enzima (come Gefitinib), e gli inibitori di tipo II che interagiscono con la forma inattiva (come Imatinib). Alcuni inibitori riescono a legarsi ad entrambe le conformazioni (come Dasatinib e Ponatinib).

Gli inibitori di tipo II legandosi alla conformazione inattiva possono occupare la tasca idrofobica secondaria per cui essere maggiormente selettivi verso una specifica TK. Il problema che ne risulta è, vista la variabilità della composizione amminoacidica, che si possano facilmente verificare mutazioni che provocano la farmacoresistenza. Un'altra problematica degli inibitori di tipo II è la loro massa molecolare; essi, infatti, tendono ad essere molecole più grandi per cui hanno maggior difficoltà ad attraversare le membrane cellulari.²³

Riassumendo, quindi, per ottenere inibitori selettivi è utile focalizzarsi su interazioni differenti da quelle mediate dall'ATP, quindi ad esempio con le due tasche idrofobiche o con altre zone non occupate dall'ATP. Infatti, è oggetto di studio una nuova generazione di inibitori (tipo III) che interagiscano soltanto con le regioni non occupate dall'ATP, questi verrebbero classificati come inibitori allosterici.

2.1.1.3 IMATINIB

Il biochimico Nicholas Lyndon che sviluppò Imatinib (commercializzato con il nome di Gleevec) negli anni 90, e l'oncologo Brian Druker che lo indirizzò per il trattamento della Leucemia mieloide cronica (CML) ricevettero il premio *Lasker-DeBakey Clinical Medical Research Award* in 2009 per aver convertito un cancro fatale in una patologia farmacologicamente controllabile, e il *Japan Prize* nel 2012 per aver sviluppato un nuovo farmaco *target* e cancro specifico.²⁴

Inizialmente Imatinib fu sviluppato come inibitore di PDGFR e solo successivamente fu trovato essere un potente inibitore della proteina chimerica Bcr-

Abl e della proteina c-KIT (coinvolta nel tumore stromale del tratto gastro-intestinale).

Imatinib è stato approvato per il trattamento della Leucemia mieloide cronica (CML) a maggio 2001 dalla FDA e successivamente a febbraio 2002 per il trattamento dei tumori stromali del tratto gastro-intestinale.²⁵

Oggi Imatinib è indicato per il trattamento di pazienti affetti da:

- leucemia mieloide cronica positivi al cromosoma Philadelphia (Bcr-Abl, Ph+), per i quali il trapianto di midollo osseo non è considerato come trattamento di prima linea;
- leucemia linfoblastica acuta con cromosoma Philadelphia positivo (LLA, Ph+) integrato con chemioterapici;
- malattie mielodisplastiche/mieloproliferative (MDS/MPD) associate a riarrangiamenti del gene del recettore per il fattore di crescita di origine piastrinica (PDGFR);
- sindrome ipereosinofila avanzata (HES) e/o con leucemia eosinofila cronica (LEC) con riarrangiamento FIP1L1-PDGFR α ;
- tumori stromali del tratto gastro-intestinale (GIST) maligni non operabili e/o metastatici, positivi al Kit (CD 117).²⁶

Sviluppo della molecola

Il *core* della struttura è composto da un'anilina sostituita da un fenile e da una piperazina. Come prima modifica è stato condensato il gruppo piridile in posizione 3 della pirimidina-*core* per aumentare l'attività (Figura 8).²⁷ Successivamente vari gruppi sono stati testati come sostituenti al fenile-*core* ma l'unico che ha dimostrato attività inibitoria verso le tirosinchinasi è stato il gruppo ammidico. È stato poi dimostrato che la presenza di un metile in posizione orto del fenile-*core* aumenta la selettività per Bcr-Abl. La molecola, però, risulta molto idrofobica e quindi poco solubile in acqua; per superare questo problema è stata aggiunta una *N*-metilpiperazina insieme ad un benzile come spaziatore: in questo modo si evita la formazione di una porzione anilinicca che può provocare effetti mutageni.²⁷

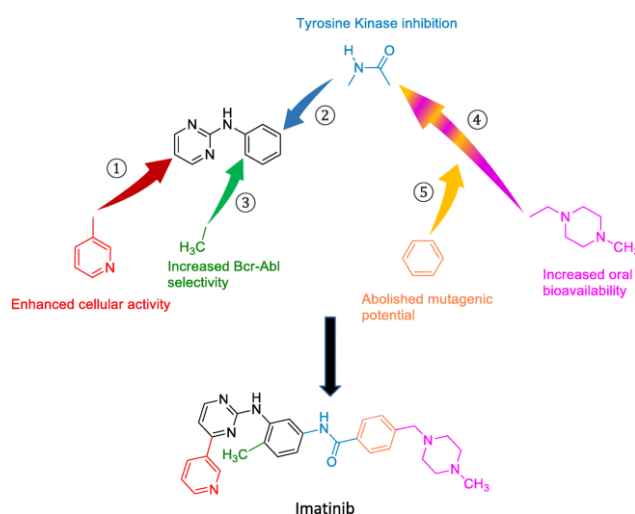


Figura 8. Ottimizzazione e funzioni dei gruppi chimici presenti nella struttura dell'Imatinib.

In questo modo è nato il primo inibitore ATP-competitivo *target* specifico. Ricordiamo che la specificità non è assoluta: è stato dimostrato, infatti, che il farmaco interagisce ugualmente con PDGFR e c-Kit che sono sempre proteine implicate nell'insorgenza di tumori se deregolate.²⁸ Tuttavia è un farmaco molto più specifico della classica chemioterapia, per cui provoca molti meno effetti nefasti alle cellule sane. Inoltre, risulta che le cellule sane riescono a sopravvivere anche se le loro proteine Abl, PDGFR e c-KIT risultano inibite, probabilmente grazie a meccanismi compensatori che non sono presenti nelle cellule tumorali.²⁴

Schema d'interazione con la proteina Bcr-Abl

L'amide forma ponti idrogeno con i residui Glu286 e Asp381. Queste interazioni orientano la parte piridin-pirimidina della molecola verso la tasca idrofobica nella quale normalmente si colloca l'adenosina dell'ATP.²⁹

È presente un ponte idrogeno tra l'ammino gruppo di Imatinib e l'amminoacido *gatekeeper* Thr315. L'importanza di quest'interazione è provata con la perdita di attività se l'ammino gruppo viene alchilato. Il metile presente in orto sul fenile si colloca nella tasca idrofobica I, questa sarebbe inaccessibile se l'amminoacido *gatekeeper* Thr315 fosse sostituito da uno più ingombrante.^{29,30}

I gruppi piridinico e pirimidinico si localizzano nella tasca idrofobica che normalmente ospita l'adenosina dell'ATP e mediano ponti idrogeni; interagiscono anche con la *hinge region*: in particolare l'azoto della piridina funge da accettore di ponte idrogeno da parte del residuo amminoacidico metionina (Met318; Figura 9).²⁹ Infine, il gruppo piperazinico si trova verso la parte più esterna della cavità e sembra formare un legame ionico con un residuo di glutammato (Glu). Questo residuo amminoacidico è conservato nelle proteinchinasi Abl, c-Kit e PDGFR ma è assente in altre proteinchinasi come EGFR e c-SRC nelle quali Imatinib non svolge un'azione inibitoria; probabilmente quest'interazione ionica è importante nella selettività della molecola.²⁹

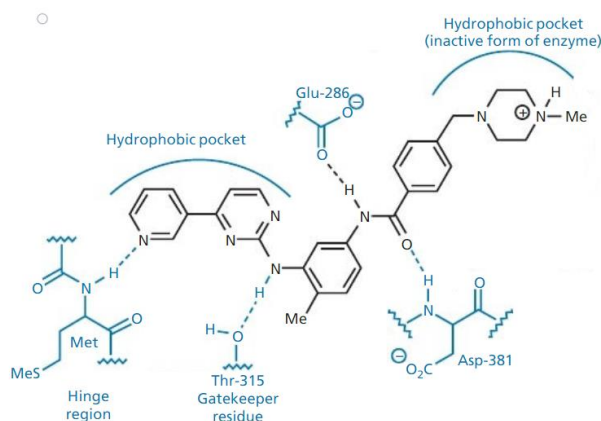


Figura 9. Schema delle interazioni di Imatinib con diverse porzioni della tasca dell'ATP all'interno di Bcr-Abl.

Meccanismi di resistenza ad Imatinib

Sfortunatamente anche con l'utilizzo di Imatinib si possono sviluppare delle farmacoresistenze. I meccanismi di resistenza sono suddivisi in due classi: dipendenti da Bcr-Abl e indipendenti da Bcr-Abl. La prima classe dipende da mutazioni puntiformi del gene BCR-ABL che possono provocare un'alterata interazione con l'inibitore, un cambiamento conformazionale, oppure un'iperespressione del gene. La seconda classe consiste nell'aumento delle pompe di efflusso e/o diminuzione del *uptake* del farmaco per cui diminuisce la quantità di

farmaco a livello intracellulare, di conseguenza non viene più raggiunta la dose terapeutica.³¹

Per far fronte a questa farmacoresistenza sono stati sviluppati farmaci di seconda e terza generazione.

I farmaci di seconda generazione come Nilotinib o Dasatinib riescono a mantenere la loro attività inibitoria in quasi tutte le mutazioni tranne nella mutazione dell'amminoacido *gatekeeper* Thr315. La sostituzione di questo amminoacido Thr315 con l'isoleucina (T315I) permette l'ingresso dell'ATP e la consecutiva attivazione della proteina ma blocca l'attività degli inibitori di prima e seconda generazione attraverso tre meccanismi: l'inaccessibilità alla tasca idrofobica II causata dall'ingombro sterico dell'isoleucina; la perdita del ponte idrogeno con la Thr315 fortemente stabilizzante; la stabilizzazione del dominio DFG nella conformazione attiva (DFG-*in*; Figura 10).³² Come già sappiamo gli inibitori di prima e seconda generazione interagiscono con la conformazione inattiva (DFG-*out*) e non sono in grado di interagire con la conformazione attiva. Per questo sono stati sviluppati gli inibitori di terza generazione.³²

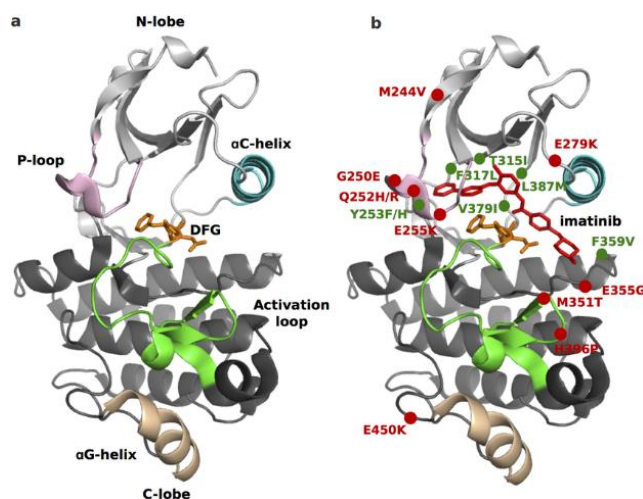


Figura 10. (a) Struttura della proteina Bcl-Abl nella conformazione inattiva (DFG-out), sono colorate le strutture che subiscono un cambiamento conformazionale. (b) Interazioni di Imatinib con la proteina Bcl-Abl (DFG-out). In verde sono evidenziate le mutazioni puntiformi con un meccanismo conosciuto e in rosso quelle con un meccanismo sconosciuto.

2.1.1.4. PONATINIB

Per cercare di bypassare la mutazione T315I è stato sviluppato un nuovo farmaco, denominato Ponatinib (commercializzato con il nome di Iclusig) e definito TKI di terza generazione. Esso è in grado di inserirsi nel dominio catalitico anche in presenza della mutazione T315I in modo tale da bloccare l'attività catalitica della proteina Bcr-Abl. Un grande vantaggio di Ponatinib è quello di legarsi sia alla proteina nativa che alla proteina mutata ed in entrambe le conformazioni, DFG-*out* e DFG-*in*.³²

Sviluppo della molecola e Schema d'interazione con la proteina Bcr-Abl

Al posto del gruppo piridin-pirimidinica di Imatinib, Ponatinib possiede una imidazo[1,2-*b*]piridazina che è localizzata nella tasca idrofobica nella quale normalmente si colloca l'adenosina dell'ATP e media un ponte idrogeno con Met318 della *hinge region*.³³ La struttura imidazopiridazinica è legata tramite un *linker* etinilico al fenile che mantiene il metile in posizione orto utile per la selettività della molecola. Il *linker* etinilico è la struttura fondamentale per superare la farmacoresistenza degli altri TKI; infatti, questa evita qualsiasi interazione con il residuo amminoacidico *gatekeeper*. Inoltre, dagli studi sul farmaco è emerso che il triplo legame aumenta di 10 volte la potenza del farmaco rispetto ad un singolo o doppio legame.³⁴ L'ammide, fondamentale per l'inibizione selettiva delle TK, garantisce le interazioni con Glu286 e Asp381. Anche il fenile usato come spaziatore nell'Imatinib è stato mantenuto ma presenta una sostituzione in posizione meta con un trifluorometile, permettendo di aumentare le interazioni di Van der Waals. Infine, viene mantenuta la *N*-metilpiperazina sempre per aumentare la solubilità in acqua e di conseguenza la sua biodisponibilità per via orale.³⁵

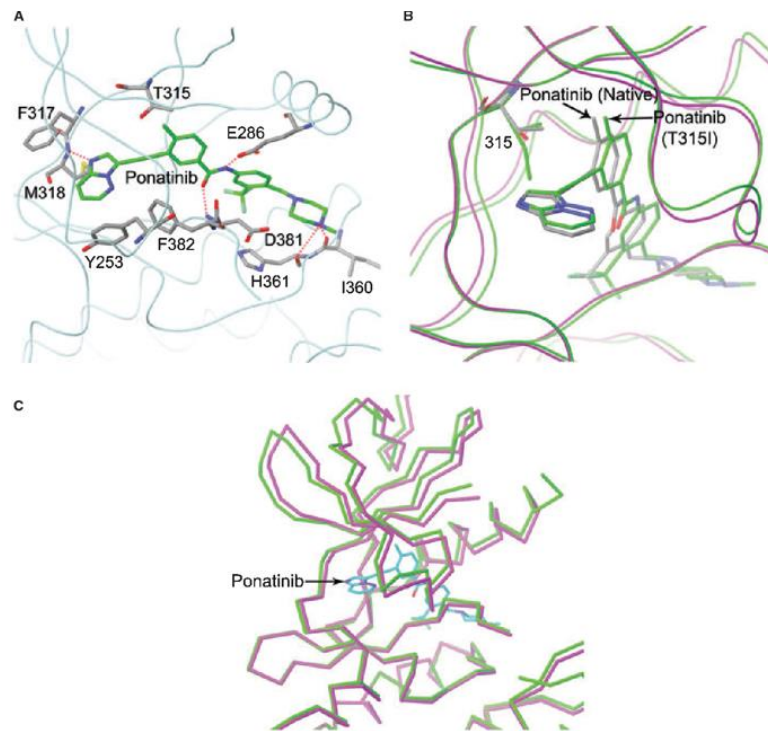


Figura 11. Modalità d'interazione di Ponatinib con la struttura nativa della proteina Bcr-Abl o quella mutata T315I. (a) Struttura cristallografica di Ponatinib con la proteina nativa Bcr-Abl, Ponatinib in verde, residui della proteina che mediano interazioni con Ponatinib in grigio, le linee tratteggiate rosse rappresentano i ponti idrogeni formati per stabilizzare il complesso. (b) Sovrapposizione di Bcr-Abl nativa (in rosa) e mutata T315I (in verde) entrambe rappresentate in complesso con il Ponatinib. Viene evidenziata la differenza di conformazione del complesso nativo e mutato. (c) Sovrapposizione di Ponatinib legata a Bcr-Abl nativa (in rosa) e mutata T315I (in verde). Viene evidenziata la diversa collocazione dei lobi N e C nella proteina nativa e in quella mutata.

Il Ponatinib è quindi indicato nei pazienti con:

- leucemia mieloide cronica (CML) in fase cronica, accelerata o blastica resistenti a Nilotinib e Dasatinib e senza successo clinico con Imatinib oppure qualora sia stata identificata la mutazione T315I;
- leucemia linfoblastica acuta con cromosoma Philadelphia positivo resistenti a Nilotinib e Dasatinib e senza successo clinico con Imatinib oppure qualora sia stata identificata la mutazione T315I.³⁶

2.1.2. CHINASI CLININA DIPENDENTI

Le chinasi cicline dipendenti (CDK) fanno parte della classe di serin/treonin chinasi, e una volta attivate vanno a fosforilare il gruppo alcolico di residui di serina o treonina preceduti da residui di prolina della proteina substrato.³⁷

Il chinoma umano conta 21 differenti CDK che sono coinvolte in diversi meccanismi di regolazione: fungono da *check-point* nel ciclo cellulare, controllano la trascrizione e alcune funzioni neuronali come la differenziazione.³⁷

L'attivazione di queste chinasi dipende dal legame con delle proteine regolatrici denominate cicline; in seguito alla fosforilazione da parte di altre chinasi e la loro successiva associazione ad una specifica ciclina, le CDK sono in grado di fosforilare substrati per far proseguire la via di trasduzione del segnale.³⁸

Le CDK, svolta la loro funzione, devono essere poi inattivate tramite l'ubiquitinazione della CDK o della ciclina (vengono distrutte dal proteosoma) oppure grazie all'intervento di specifici inibitori.³⁹

Nel ciclo cellulare le CDK controllano il passaggio della cellula da una fase all'altra: se la cellula va incontro ad un danno irreversibile, ad esempio al DNA, le CDK vengono inibite e la cellula non può proseguire alla fase successiva. Se invece il danno è riparabile la cellula potrà riprendere il ciclo.⁴⁰

La concentrazione di cicline varia periodicamente nel corso del ciclo cellulare. Quando il livello di cicline aumenta, esse si associano alle loro rispettive CDK formando eterodimeri stabili in grado di fosforilare i loro substrati, mentre quando il livello di cicline cala non si forma il complesso e il sito catalitico delle CDK rimane inattivo.⁴¹

Struttura generale delle CDK

Nella famiglia delle CDK la struttura generale rimane conservata. Essa è caratterizzata da due lobi, uno *N*-terminale composto principalmente da foglietti- β e uno *C*-terminale più esteso che contiene principalmente α -eliche. Nel lobo-*N* si osservano: una α -elica-*C* (che contiene una sequenza PISTVRE nelle CDK4)

ripiegata contro i foglietti- β ; una sequenza alanina, leucina, lisina (ALK) nel foglietto- $\beta 3$.^{42,43}

Il sito catalitico è localizzato nella fessura tra i lobi *N* e *C*. Dopo la fosforilazione di una treonina della CDK e la formazione del complesso con una specifica ciclina si ha un riarrangiamento della tasca catalitica che permette l'ingresso dell'ATP.⁴¹

Nella struttura delle CDK è presente un *T-loop*, denominato così per la presenza di una treonina (Thr172 nelle CDK4) che viene fosforilata da una chinasi attivatrice (come la CDK7/H). Il *T-loop* ha una struttura ad α -elica che una volta fosforilato cambia conformazione e permette l'attivazione della chinasi. Nella conformazione inattiva il *T-loop* è stabilizzato tramite interazioni con il lobo *N* e *C*.⁴¹

Infine, si nota la presenza di un *loop* di attivazione (*P-loop*) che comincia con la sequenza acido aspartico, fenilalanina, glicina, (DFG) e finisce con la sequenza alanina, prolina, acido glutammico (APE). Nella forma attiva della chinasi il residuo di acido glutammico di APE forma un'interazione ionica con una lisina e un'arginina interagisce con la fosfotreonina del *T-loop*; in questo modo il *T-loop* si orienta al di fuori del sito catalitico muovendo l'elica-C che trasmette il segnale di attivazione alla chinasi e viene agevolata l'interazione con la ciclina (Figura 12).⁴¹

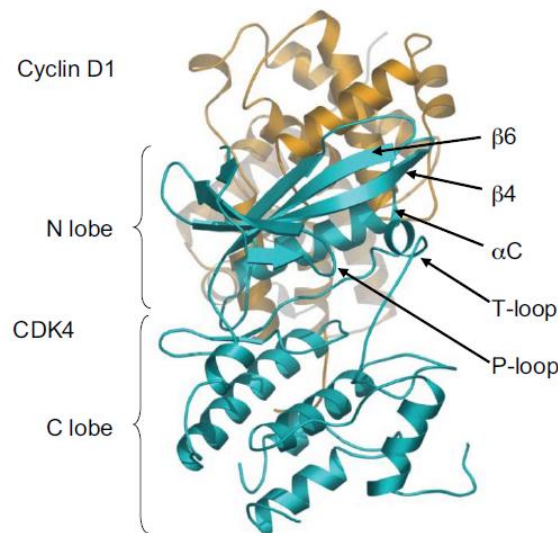


Figura 12. Struttura cristallografica del complesso di CDK4/ciclinaD, in azzurro la CDK4 e, in arancio, la ciclina D.

Le cicline invece sono formate da due lobi caratterizzati da compatte α -eliche che variano di lunghezza e posizione in base ai residui superficiali di ogni ciclina, i differenti amminoacidi di superficie permettono la specificità di substrato per permettere l'interazione con una specifica CDK.⁴³

L'interazione tra le cicline e le CDK avviene principalmente tramite l'elica-C (in particolare con la sequenza PISTVRE nelle CDK4) e il lobo N.⁴³

Complessi CDK/ciclina e le loro funzioni

Ad ogni fase del ciclo cellulare ogni ciclina lega una specifica CDK; questi complessi si trovano solo in determinati momenti del ciclo cellulare (Figura 13).

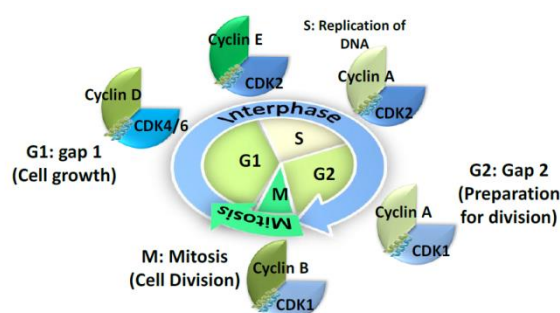


Figura 13. Schema rappresentativo delle varie fasi del ciclo cellulare con i corrispondenti complessi CDK/ciclina.

Le CDK1, CDK2, CDK3, CDK4, CDK6 e CDK7 sono coinvolte nella regolazione del ciclo cellulare; le CDK7, CDK8, CDK9, CDK10 e CDK12 regolano la trascrizione; le CDK 5, 11 sono implicate in funzioni neuronali. Le CDK2, CDK5, CDK6 e CDK9 sono anche connesse alla differenziazione cellulare e le CDK1, CDK2, CDK4, CDK5, CDK6 e CDK11 partecipano anche all'apoptosi. Le CDK1, CDK3, CDK9 e CDK12 partecipano anche all'ematopoiesi, l'angiogenesi, proteolisi, e riparazione del DNA e le CDK16 sono implicate nella spermatogenesi.^{9,44}

Il ciclo cellulare è un processo finemente controllato da una serie di eventi coordinati e dipendenti tra loro dai quali dipende la corretta proliferazione cellulare.

Ogni processo è la diretta conseguenza dell'evento precedente e la causa di quello successivo. Il ciclo cellulare può essere suddiviso in quattro fasi (M, G1, S, G2) e una di quiescenza (G0).⁴⁵

Il complesso CDK1 con ciclina B permette l'entrata della cellula nella mitosi (transizione G2-M), mentre in complesso con la ciclina A controlla il passaggio dalla fase G1 alla fase S. La CDK2 viene attivata dalle cicline E ed A per permettere la progressione in fase S. La CDK3 associata alla ciclina C partecipa alla regolazione della transizione G1-S ma è anche coinvolta nella transizione G0-G1. CDK4 e CDK6 sono attivate dalla ciclina D e permettono la progressione nella fase G1 in risposta a fattori di crescita.⁴¹ Queste ultime, associate alla ciclina D sono in grado di fosforilare il fattore repressorio retinoblastoma (Rb) che libera parzialmente il fattore di trascrizione E2F e permette l'espressione dei geni necessari al successivo *checkpoint*.⁴⁶ Viene quindi ad essere espressa la ciclina E che attiva la CDK2, permettendo l'iperfosforilazione di Rb che rilascia completamente il fattore di trascrizione E2F permettendo l'uscita della cellula dalla fase G1 e l'entrata nella fase S. Una deregolata attività delle CDK o delle cicline può portare a diversi processi patologici tra cui lo sviluppo di tumori. Infatti, essendo coinvolte in diverse vie di trasduzione del segnale utili alla crescita e sviluppo cellulare, una loro alterata espressione o un mancato controllo inibitorio sono spesso implicati nell'insorgenza di cancerogenesi, per cui:

- la presenza di mutazioni o l'iperespressione dei proto-oncogeni coinvolti nella trascrizione di CDK possono portare ad una iperattivazione delle CDK e promuovere la crescita cellulare;
- una sovraespressione delle cicline porta ad un'eccessiva attività delle CDK;
- alcune mutazioni inattivano i *checkpoint*, venendo così a mancare i controlli per passare da una fase del ciclo cellulare all'altra, anche se vengono riscontrati certi danni la cellula continua la sua replicazione;
- con mutazioni sui geni oncosoppressori vengono a mancare le proteine che hanno un ruolo repressivo nella crescita cellulare, come ad esempio il fattore retinoblastoma;

- un'errata espressione o controllo degli inibitori delle chinasi cicline dipendenti (famiglia INK4 o Cip and Kip) così che viene a mancare l'inibizione del ciclo cellulare.⁴⁷⁻⁴⁹

Le CDK sono quindi state studiate per poter progettare delle *targeted therapy* nei tumori nei quali sono coinvolte. Le CDK sono quindi ottimi bersagli per arrestare la crescita tumorale. La CDK1 sembra implicata in pochissimi sviluppi cancerogenici, ed è invece stato dimostrato che la CDK2 può essere sovraespressa nel cancro colon-retto e nel cancro ai polmoni; la CDK4 è amplificata in vari tipi di sarcoma, mutata nel cancro ai polmoni e in vari cancri tissutali; la CDK6 porta a linfoma se amplificata mentre se mutata può provocare l'insorgenza di vari cancri tissutali.⁴¹ Più recentemente è stato scoperto che le CDK4 e CDK6 possano essere coinvolte nello sviluppo del tumore al seno.⁵⁰

Malgrado la CDK1 possa sviluppare qualche raro processo tumorale, non è un buon bersaglio per i farmaci *target* specifici. È stato osservato che una sua inibizione porta a morte embrionale. Inoltre, sembra che la CDK1 sia in grado di compensare la mancanza di altre CDK e cicline (tranne le cicline A2 e B1 che risultano indispensabili) nelle varie fasi del ciclo cellulare associandosi con le diverse cicline. La CDK2 è risultata essenziale nelle fasi precoce del ciclo cellulare che sono spesso deregolate nelle cellule tumorali, di conseguenza una sua inibizione sembra bloccare alcuni tipi di cellule tumorali senza avere effetti tossici sulle cellule sane. È tuttavia difficile individuare inibitori specifici di CDK2 che non abbiano attività su CDK1. Le CDK4 e CDK6 non sono essenziali per l'entrata della cellula nel ciclo cellulare, ma sono necessarie per la proliferazione di alcune cellule specializzate e se vengono inibite non sembrano danneggiare le cellule sane.³⁷

2.1.2.1. STRATEGIE DI INIBIZIONE DELLE CDK

Come già citato sopra, uno sbilanciamento delle CDK, delle cicline o dei loro inibitori porta spesso a cancerogenesi, per questo sono state studiate come bersaglio farmacologico. Fin dagli anni 80 è cominciata la ricerca di farmaci capaci di bloccare l'iperattività dei complessi CDK/ciclina per rallentare e bloccare lo sviluppo tumorale.⁵¹

Sono state pensate varie strategie di inibizione, utilizzando molecole, come per esempio:

- molecole peptidomimetiche: essendo fondamentale per l'attività l'interazione tra CDK e ciclina e il successivo legame ad una proteina (fattori oncosoppressori come Rb o fattori trascrizionali), è possibile bloccare il sito di *binding* tra CDK/ciclina così da impedire l'attivazione del complesso. Il problema è che questo sito di *binding* è molto piccolo e di difficile accesso. quindi fino ad oggi non sono state riportate piccole molecole capaci di interagire in quel sito. Sono, invece, state progettate molecole analoghe agli inibitori delle CDK o ai substrati (fattori oncosoppressori come Rb o fattori trascrizionali) per interferire con la formazione del legame CDK/ciclina o per impedire il cambiamento conformazionale richiesto per l'attivazione del complesso. Sfortunatamente l'utilizzo di queste piccole molecole è stato limitato a causa delle scarse proprietà farmacocinetiche, spesso solo una piccolissima quantità di farmaco riesce a raggiungere il sito tumorale a causa della rapida degradazione;
- inibitori non ATP competitivi: piccole molecole in grado di legarsi ad un sito allosterico adiacente alla tasca dell'ATP bloccandone l'attività. Sono state scoperte molecole capaci di interagire con CDK2 e CDK7;
- inibitori ATP competitivi: sono molecole ATP mimetiche, cioè possono legarsi al sito di *binding* dell'ATP ed impedire l'interazione dell'enzima con l'ATP. Il problema di queste molecole è legato alla scarsa selettività.⁵¹

Inibitori ATP competitivi

Inizialmente per bloccare l'iperattività dei complessi CDK/cicline sono stati purificati composti naturali, ma i composti di prima generazione (detti *pan*-CDK) come Flavopiridolo (noto anche come Alvocidib) erano poco specifici (Figura 14). Questi composti interagivano con diverse CDK ma anche con altre chinasi, e per questo motivo comportavano gravi effetti collaterali.⁵²

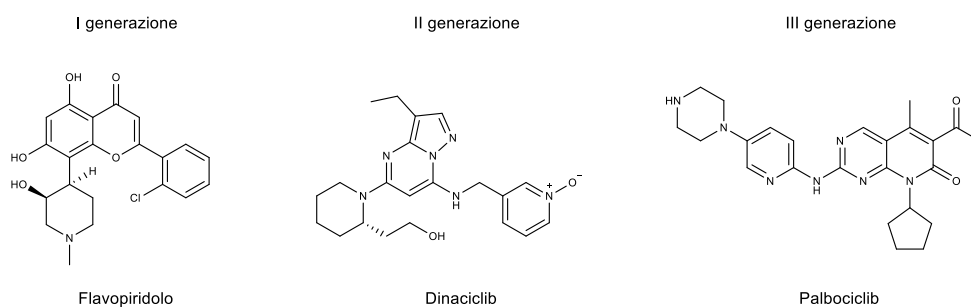


Figura 14. Strutture chimiche di Flavopiridolo, Dinaciclib e Palbociclib.

Anche lo sviluppo dei farmaci di seconda generazione, come il Dinaciclib non ha avuto successo perché, nonostante fossero più selettivi della prima generazione, interagivano con CDK1 e CDK2 che sono fondamentali per lo sviluppo della cellula. I farmaci di terza generazione, invece, hanno dato buone speranze: sono selettivi per le CDK4 e CDK6, e ad oggi ci sono già farmaci approvati dalla FDA come il Ribociclib e il Palbociclib.³⁷

2.1.2.2. PALBOCICLIB

Nel febbraio 2015 è stato approvato dalla FDA il Palbociclib (commercializzato come Ibrance). Palbociclib è un inibitore ATP competitivo reversibile selettivo per CDK4 e CDK6, che pur non essendo proteine omologhe, hanno alcune funzioni ridondanti nella progressione del ciclo cellulare.⁵³ L'interazione di Palbociclib con queste CDK blocca la tasca dall'ATP impedendo così la casata di segnale e la proliferazione delle cellule tumorali. La sua efficacia è però vincolata dalla presenza di Rb.⁴¹ Infatti, in alcune linee cellulari nelle quali si ha la perdita del

fattore Rb, è stata associata la perdita di attività del Palbociclib⁵⁴. Per questo motivo è stata studiata l'associazione di Palbociclib con altri farmaci, in quanto è stato rivelato che l'associazione con agenti antiestrogeni ha favorito la riattivazione di Rb e la successiva inibizione della fosforilazione dello stesso con conseguente riduzione del segnale di E2F e l'arresto della crescita cellulare.⁵⁵ L'asse CDK4 e CDK6 con la ciclina D è coinvolto nello sviluppo del cancro al seno positivo ai recettori ormonali (HR) e negativo al recettore del fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2).⁵⁶ Palbociclib è indicato per il trattamento del carcinoma mammario localmente avanzato o metastatico. Può essere somministrato in associazione con un inibitore dell'aromatasi, come il Letrozolo, oppure con Fulvestrant, un antagonista dei recettori estrogeni, in donne che hanno ricevuto una terapia endocrina precedente.⁵³

Sviluppo della molecola

Il *core* di Ponatinib consiste in un anello piridopirimidinico, in grado di conferire attività inibitoria nei confronti di diverse chinasi.^{57,58} In seguito sono stati aggiunti vari sostituenti in modo da ottenere selettività verso le CDK4 e CDK6.

La posizione 6 è importante per la selettività, in quanto questo sostituente va ad occupare la *Hydrophobic backpocket* delimitata dal residuo *gatekeeper* indispensabile per ottenere selettività tra le differenti chinasi. Nelle CDK2, CDK4 e CDK6 il residuo è una fenilalanina.⁵⁹ Nel Palbociclib in posizione 6 è presente un acetile che contribuisce al riconoscimento del *target* in quanto nel sito di legame è presente un amminoacido idrofobico (Phe98).

In posizione 5 è stato osservato che la presenza di un metile è molto utile nell'orientare in modo corretto l'acetile in posizione 6.⁶⁰

In posizione 3 è stata notata la necessità di aver un cicloalchile che possa interagire con una tasca lipofila secondaria nel tentativo di ottenere selettività verso la CDK4 piuttosto che la CDK2, dopo diversi tentativi il ciclopentile è risultato un ottimo sostituente.⁶¹

L'interazione dell'ammina tramite ponti idrogeno con residui della *hinge region*, è indispensabile per l'attività enzimatica; così come l'azoto pirimidinico che interagisce con l'istidina (H100).⁶²

In posizione orto dell'anilina, la sostituzione di un atomo di carbonio con un azoto aumenta ancora di più la selettività verso la CDK4 piuttosto che la CDK2.⁶⁰

Infine, in posizione 5', la presenza di una piperazina aumenta la solubilità della molecola in acqua, diminuendo il coefficiente di distribuzione ottanolo/acqua della molecola cosicché aumenti la sua biodisponibilità (Figura 15).⁴¹

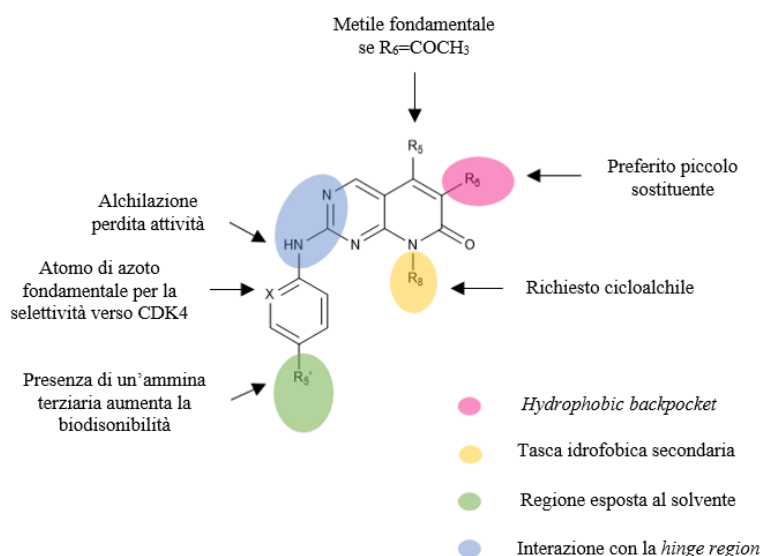


Figura 15. Analisi strutturale del Palbociclib.

Schema d'interazione con la CDK4/6

Nella struttura cristallografica del complesso CDK6/Palbociclib si osserva la conformazione inattiva della CDK6; in particolare l' α -elica del lobo-N è distante dal sito attivo e anche il segmento di attivazione assume un'altra conformazione.⁶³ Inoltre, anche i foglietti β_2 e β_3 cambiano orientamento dalla conformazione attiva a quella inattiva (Figura 16).

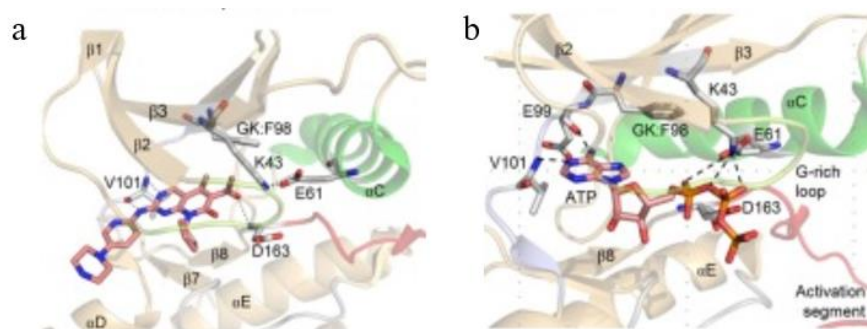


Figura 16. Rappresentazione schematica del sito catalitico della CDK6; (a) Interazione del Palbociclib con CDK6 nella conformazione inattiva; (b) Interazione del ATP con CDK6 nella conformazione attiva.

Nel docking di Palbociclib con CDK6, sono state evidenziate le interazioni che vengono stabilite. In particolare, sono state osservate le interazioni fondamentali per l'attività, ossia il ponte idrogeno tra l'ammina secondaria e la Val101, e quello tra l'azoto presente nella pirimidina e l'His100. Si può notare anche come il metile presente sull'anello lattonico orienta l'acetile in modo che si possa instaurare un altro ponte idrogeno tra l'Asp 163 e l'ossigeno dell'acetile; queste due strutture non creano ingombro per il residuo amminoacidico Phe98 che funge da *gatekeeper*.⁶⁴ La piperazina, invece, rimane esposta al solvente all'ingresso della tasca dove si trovano i residui Aps104 e Thr107. Per ottenere selettività verso specifiche CDK è indispensabile conoscere la loro sequenza amminoacidica e la conformazione che adottano, in modo da capire quali residui amminoacidici occupano la tasca catalitica. Infatti, è presente una differenza di amminoacidi all'ingresso del sito catalitico, nelle CDK1, CDK2, CDK3, CDK5 il residuo Thr107 presente nelle CDK4 e CDK6 è sostituito da una lisina che provoca repulsioni elettrostatiche con la piperazina. Anche i residui presenti nella *hinge region* possono variare, ad esempio nelle CDK1 e 2 non è presente l'istidina ma una fenilalanina che non permette la formazione del ponte idrogeno indispensabile per l'attività inibitoria (Figura 17).⁶⁴

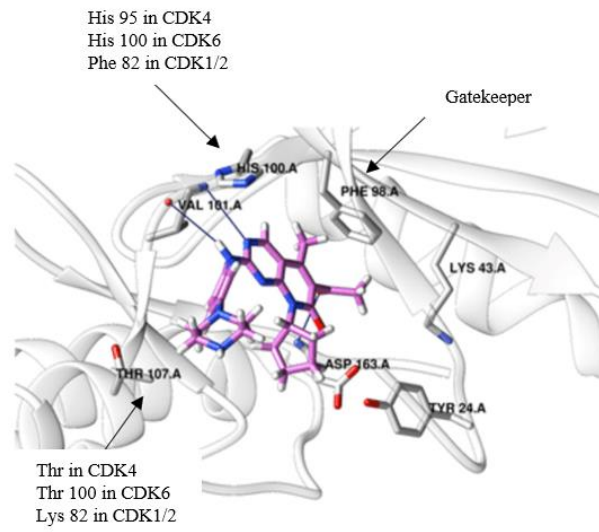


Figura 17. Rappresentazione schematica delle interazioni mediate dal Palbociclib nella CDK6.

3. OBIETTIVO

Negli ultimi decenni la ricerca di nuovi agenti antitumorali si sta rivolgendo, con sempre maggior interesse, a tecniche e approcci terapeutici innovativi.

Lo sviluppo della *targeted therapy* ha permesso di creare farmaci dotati di elevata selettività nei confronti delle cellule tumorali, portando quindi ad effetti collaterali di minor entità rispetto agli agenti citotossici e chemioterapici tradizionali. Le chinasi rappresentano un *target* di grande interesse per il trattamento di patologie neoplastiche, in quanto la loro inibizione consente lo spegnimento di numerosi *pathway* intracellulari con un ruolo chiave nella trasmissione di segnali di crescita, di differenziamento e nel controllo del ciclo cellulare. Tuttavia, nonostante essi rappresentino un approccio innovativo alla terapia antitumorale, presentano spesso ancora alcuni svantaggi che ne limitano l'utilizzo e compromettono l'esito del trattamento.

L'impiego di nanotecnologie in ambito biomedico sta assumendo un'importanza sempre maggiore in quanto l'utilizzo di *Drug Delivery* rende possibile la veicolazione di farmaci in siti specifici dell'organismo, migliorandone così le proprietà biofarmaceutiche e la cinetica di rilascio.

L'obiettivo di questa tesi è quindi la sintesi di analoghi di Imatinib, Ponatinib e Palbociclib per permetterne il *loading* in sistemi di *Drug Delivery* come liposomi e nanoparticelle d'oro. Al fine di consentire il caricamento dei tre farmaci in questi sistemi di rilascio sono stati progettati degli analoghi acetoniati. Infatti, la funzione *N*-metilica terminale di Imatinib e Ponatinib, e l'ammina secondaria della piperazina di Ponatinib sono state sostituite con una funzione *N*-acetoniatica. Tale funzione è necessaria per la successiva condensazione tramite legame idrazonico a *linker* lipofili per il caricamento in liposomi o a *linker* lipoici per il legame a nanoparticelle d'oro, in questo modo si ottengono profarmaci pH-sensibili.

Le strutture degli analoghi acetoniati di Imatinib, Ponatinib e Palbociclib sono riportati in Figura 18.

I sistemi di *Drug Delivery* nei quali potranno essere legati gli analoghi dei farmaci sintetizzati sono rappresentati in Figura 19.

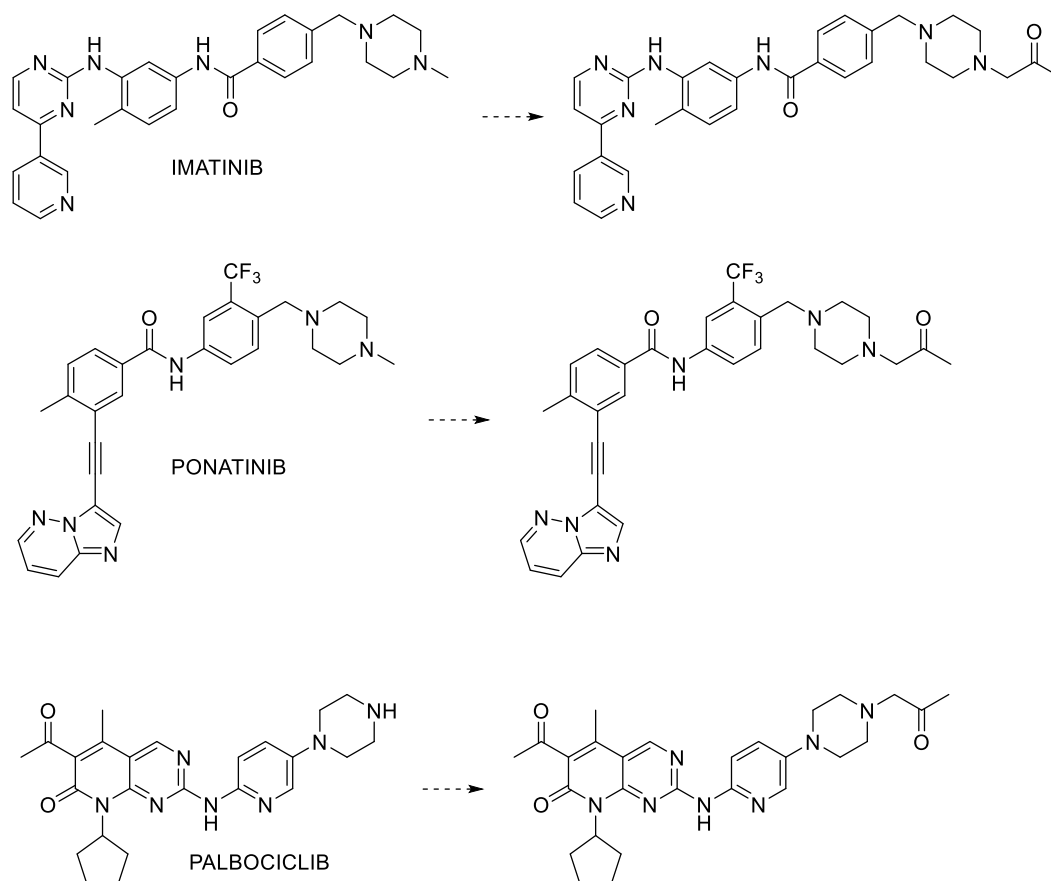


Figura 18. Struttura di Imatinib, Ponatinib e Palbociclib e i rispettivi analoghi acetonylati.

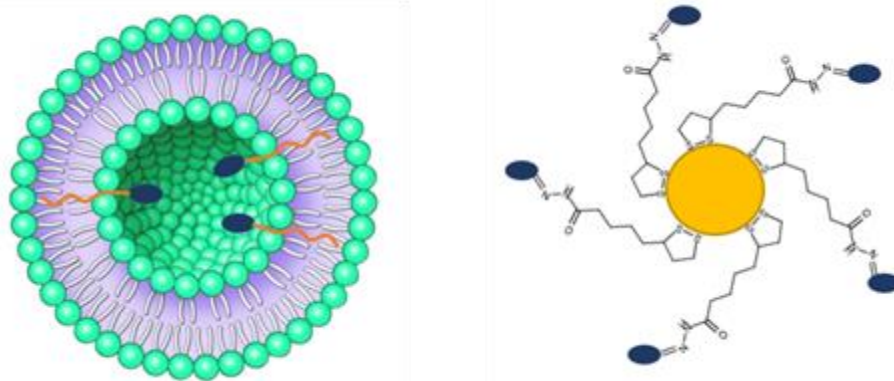


Figura 19. (a) Schema di un liposoma con doppio strato fosfolipidico (verde) nel quale è inserito un linker idrofobico (arancione) e alla quale estremità è legato il farmaco (blu). (b) Rappresentazione di una nanoparticella d'oro sulla quale sono adsorbiti dei linker disolfuri alla quale estremità è legato il farmaco (blu).

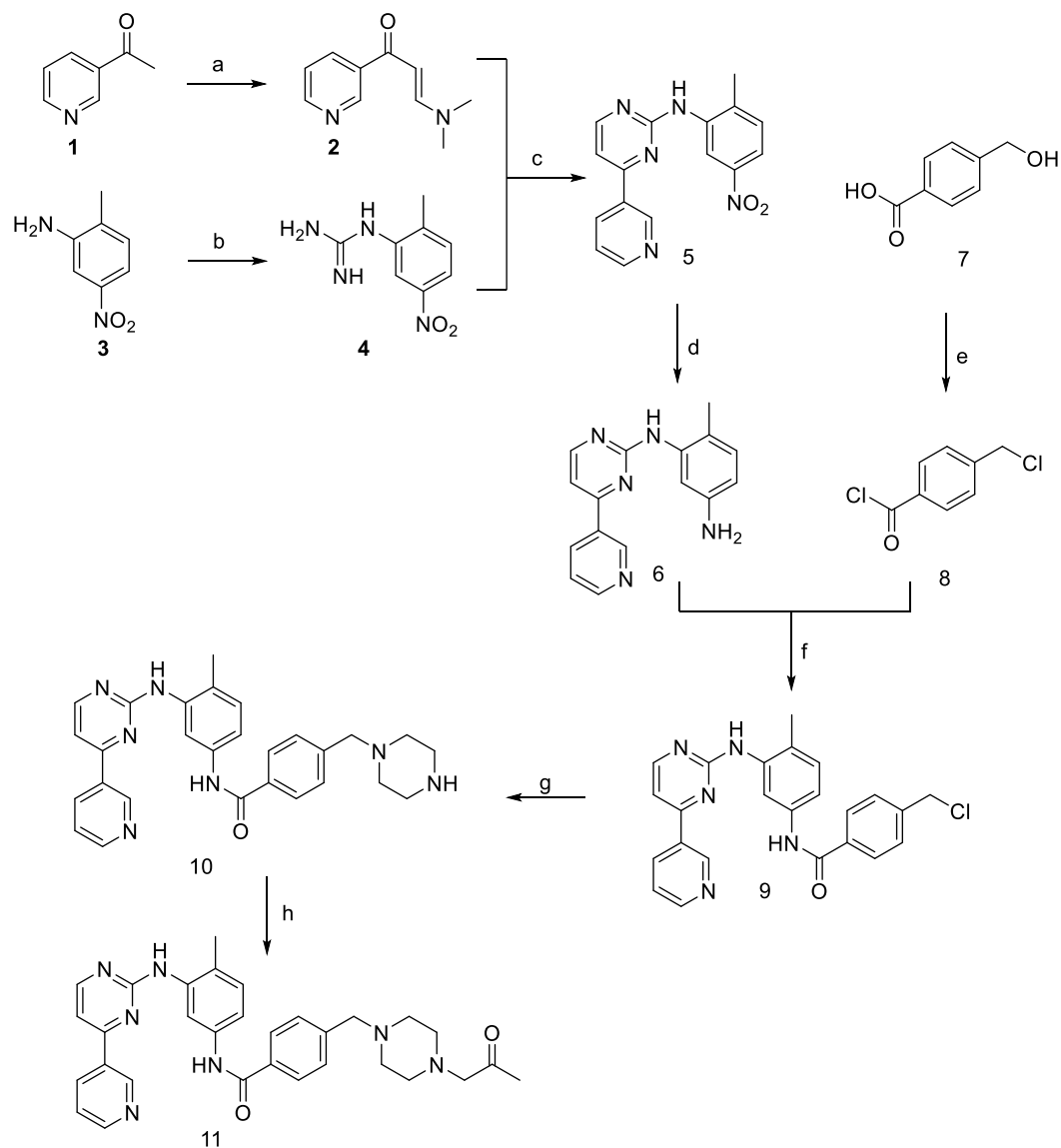
4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 SINTESI DI ACETONIL-IMATINIB

Come prodotto di partenza per la sintesi di acetoni-imatinib (schema 1), è stata utilizzata la 3-acetilpiridina (**1**) che è stata fatta reagire con dimetilformamide dimetilacetale in xilene portando all'ottenimento del composto **2** per eliminazione di due molecole metanolo.

Parallelamente, la 2-metil-5-nitroanilina (**3**) è stata condensata con cianamide tramite catalisi acida per acido nitrico 65% in etanolo, portando al derivato guanidinico in forma di sale nitrato. Per ottenere il derivato guanidinico in forma di base libera è stata quindi aggiunta una soluzione alcalina di idrossido di sodio portando all'ottenimento del composto **4**.

Successivamente, i composti **2** e **4** sono stati condensati in isopropanolo mediante irraggiamento con microonde, portando alla formazione dell'anello pirimidinico. La reazione è favorita dall'eliminazione di dimetilammina che, essendo un gas, si allontana dall'ambiente di reazione e per il principio di Le Chatelier l'equilibrio di reazione risulta spostato verso destra. Il gruppo nitro del composto **5** è stato quindi ridotto a gruppo amminico mediante trattamento con stagno cloruro in metanolo, ottenendo così il composto **6**.



Schema 1. Sintesi di acetonil-imatinib. Condizioni di reazione:

- a. DMF-DMA, xilene, riflusso, 3 ore, resa 95%;
- b. 1. NH_2CN , HNO_3 65%, H_2O , EtOH, riflusso, 16 ore;
- c. 2. NaOH, H_2O , resa 65%;
- d. IPrOH, MW, 100°C , 1 min, 130°C , 10 min, 150°C , 10 min, resa 47%;
- e. $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, MeOH, riflusso, 3 ore, 50%;
- f. SOCl_2 , DMF, CH_2Cl_2 , riflusso, 18 ore, resa quantitativa;
- g. TEA, THF, Tamb, 30 min, resa 81%;
- h. Piperazina, diossano, 90°C , 4 ore, 40%;
- i. Cloroacetone, KI, K_2CO_3 , acetone, riflusso, 1 ora.

Parallelamente, l'acido 4-idrossimetilbenzoico (**7**) è stato fatto reagire con cloruro di tionile in presenza di dimetilformamide, che funge da catalizzatore (Figura 20), ottenendo così il composto **8**.

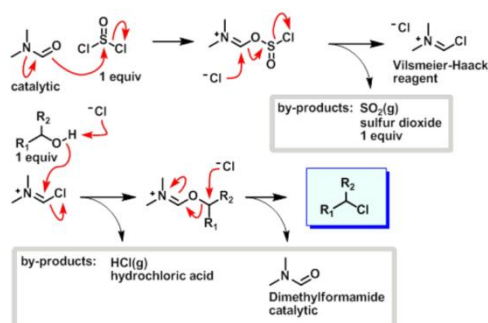


Figura 20. Meccanismo di clorurazione in presenza di DMF

Il composto **6** è stato fatto reagire con il composto **8** in tetraidrofurano in presenza di trietilammina per neutralizzare l'acido cloridrico formatosi durante la reazione e portando all'ottenimento del derivato ammidico **9**. Successivamente, il composto **9** è stato sostituito in posizione 4 con piperazina in diossano, ottenendo il composto **10**. Va sottolineato che questa reazione richiede che la piperazina sia completamente solubilizzata in diossano prima dell'aggiunta del derivato clorobenzilico in modo che sia tutta disponibile per la reazione: essa, infatti, è presente in largo eccesso nella reazione, in quanto funge allo stesso tempo da base e da reagente.

Infine, il composto **10** è stato fatto reagire con cloroacetone in acetone, in presenza di ioduro di potassio (che velocizza la reazione attraverso lo scambio ioduro/cloruro) e carbonato di potassio (che neutralizza l'acido cloridrico formatosi), ottenendo così l'acetonil-imatinib (**11**).

4.2 SINTESI DI ACETONIL-PONATINIB

Come prodotto di partenza per la sintesi di acetoni-ponatinib è stata utilizzata la imidazo[1,2-*b*]piridazina (**12**) che, trattata con *N*-bromosuccinimide, ha portato alla formazione del derivato **13**, bromurato in posizione 3 (Schema 2). Durante la reazione si ha liberazione di succinimide che è stata completamente rimossa durante le operazioni di work-up tramite lavaggi con acqua e carbonato di sodio. Si è, infatti, notato che anche tracce di succinimide nel prodotto di reazione portavano all'impedimento della successiva reazione di condensazione. Il composto **13** è stato quindi fatto reagire secondo le condizioni della reazione di Sonogashira con etiniltrimetilsilano in presenza di palladio trifenilfosfino tetrakis, rame ioduro e *N,N*-diisopropiletilammina in dimetilformammide per ottenere il composto **14**. La reazione di Sonogashira è caratterizzata da due cicli catalitici: quello del rame coinvolge il derivato alchिनico, aumentandone l'acidità e la reattività; quello del palladio coinvolge, invece, il gruppo arilico che subisce un'addizione ossidativa (OA). La successiva transmetallazione (TM) porta ad avere entrambi i sintoni organici legati all'atomo di palladio, consentendo così l'eliminazione riduttiva (RE) che porta alla formazione del prodotto finale (Figura 21).

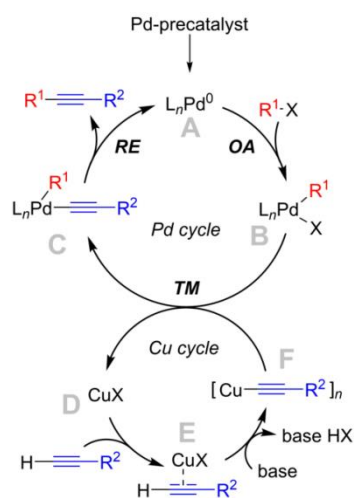


Figura 20. Ciclo catalitico dell'accoppiamento di Sonogashira.

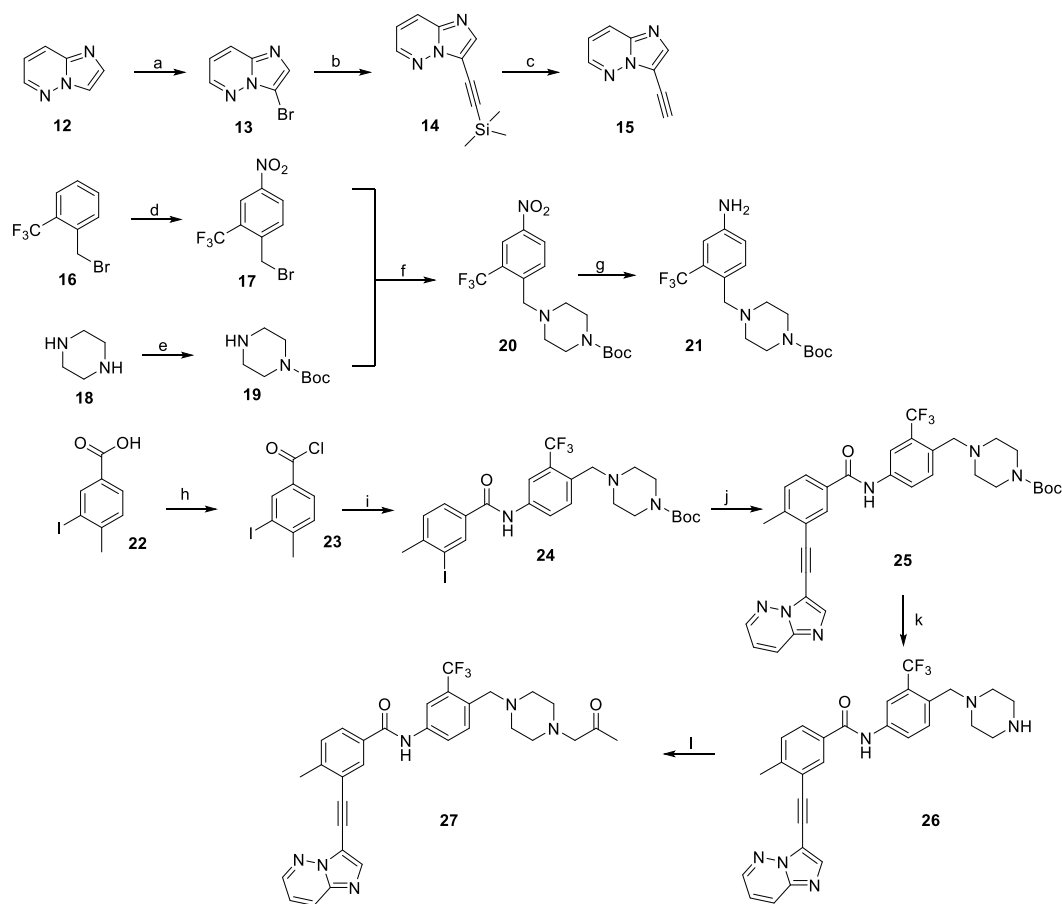
Successivamente, la funzione trimetilsililica del composto **14** è stata rimossa per trattamento con fluoruro di potassio in metanolo ottenendo così il composto **15**.

Parallelamente, mediante reazione di nitrurazione sul 2-trifluorometil-benzilbromuro (**16**) è stato ottenuto il composto **17**. Quest'ultimo è stato fatto reagire con il composto **19**, precedentemente ottenuto per condensazione della piperazina (**18**) con il di-tert-butildicarbonato in metanolo, ottenendo quindi il composto **20**. Il gruppo nitro del composto **20** è stato ridotto a gruppo amminico con idrazina idrata in presenza di ferro cloruro in metanolo, ottenendo il composto **21**.

Tramite reazione di clorurazione dell'acido 3-iodo-4-metilbenzoico (**22**) con cloruro di tionile è stato ottenuto il composto **23**, che è stato successivamente condensato al composto **21** in presenza di *N,N*-diisopropiletilammina e dimetilamminopiridina (che agisce da catalizzatore) in tetraidrofurano, ottenendo quindi il derivato ammidico **24**.

Il composto **15** è stato condensato con il composto **24**, nuovamente secondo le condizioni della reazione di Sonogashira, ottenendo il composto **25**, successivamente deprotetto per trattamento con acido trifluoroacetico, ottenendo così il composto **26**.

Infine, il composto **26** è stato fatto reagire con cloroacetone in presenza di carbonato di potassio in dimetilformammide, ottenendo l'acetoni-ponatinib (**27**).

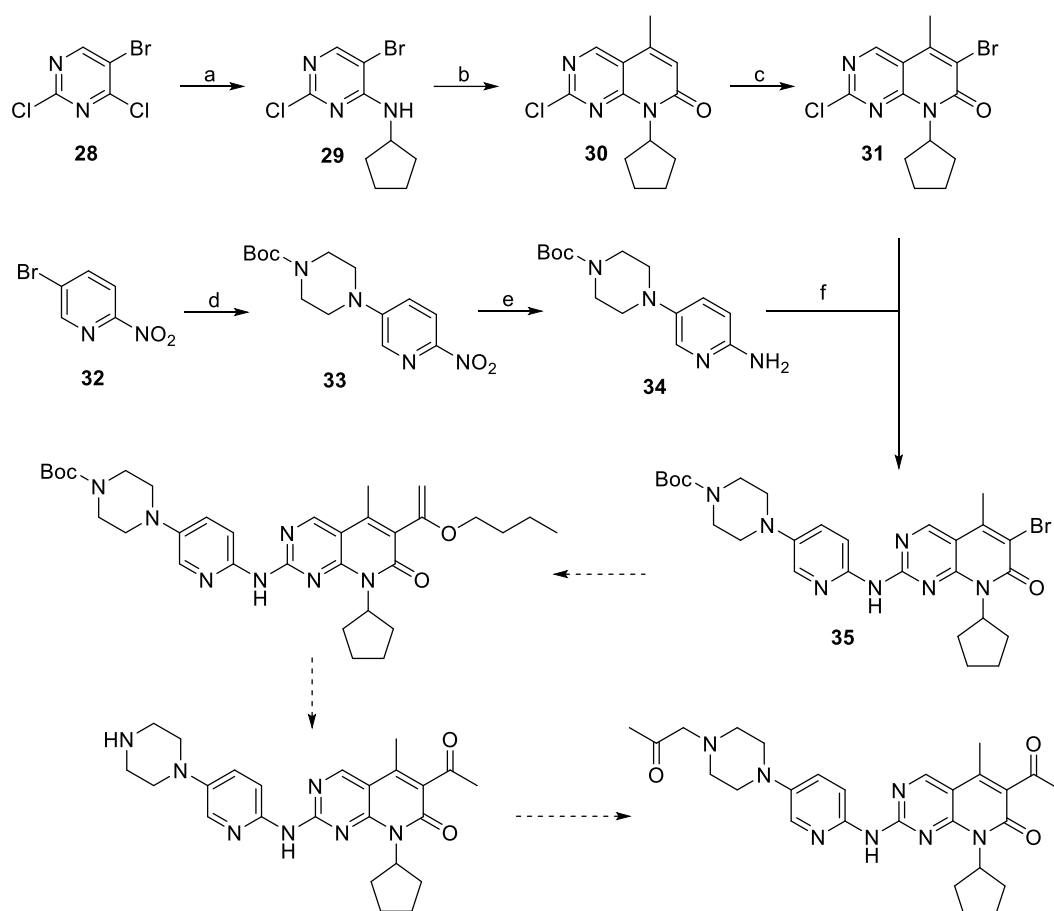


Schema 2. Sintesi di acetonil-ponatinib. Condizioni di reazione:

- N*-bromosuccinimide, CH₂Cl₂, riflusso 1 ora, resa 75%;
- Etiniltrimetilsilano, Pd(PPh₃)₄, CuI, DIPEA, Toluene/TEA, Tamb, 72 ore, resa quantitativa;
- KF, MeOH, Tamb, 1 ora, resa quantitativa;
- KNO₃, H₂SO₄/AcOH, Tamb, 1 ora, resa 80%;
- Di-*tert*-butildicarbonato, MeOH, Tamb, 16 ore, resa 55%;
- TEA, CH₂Cl₂, Tamb, 2,5 ore, resa quantitativa;
- NH₂NH₂ • H₂O, FeCl₃, MeOH, riflusso, 1.5 ore, resa quantitativa;
- SOCl₂, riflusso, 3 ore, resa quantitativa;
- 21**, DIPEA, DMAP, THF, Tamb, 17 ore, resa 54%;
- 15**, Pd(PPh₃)₄, CuI, DIPEA, DMF, Tamb, 24 ore, resa 44%;
- TFA, CH₂Cl₂, Tamb, 5 ore, resa quantitativa;
- Cloroacetone, K₂CO₃, DMF, Tamb 1,5 ore, resa 90%.

4.3 SINTESI DI ACETONIL-PALBOCICLIB

Come prodotto di partenza per la sintesi di acetonil-palbociclib è stata utilizzata la 5-bromo-2,4-dicloroprimitidina (**28**) che è stata condensata, in posizione 4, con ciclopentilammina in presenza di trietilammina, ottenendo il composto **29** (Schema 3).



Schema 3. Sintesi di acetonil-palbociclib. Condizioni di reazione:

- Ciclopentilammina, TEA, EtOH, Tamb, 2 ore, resa 78%;
1. Acido crotonico, Pd(OAc)₂, TEA, NMP, 65°C, 16 ore; 2. Ac₂O, 65°C, 2 ore, resa 64%;
- Acido ossalico, NBS, ACN, 60°C, 24 ore, 76%;
- 19**, LiCl, TEA, DMSO, 65°C, 16 ore, 23%;
- NH₂NH₂ · H₂O, FeCl₃, MeOH, riflusso, 30 min, resa 84%;
- IPrCl 2M in THF, acido acetico, THF, 60°C, 1.5 ore, Tamb, 16 ore, 45°C, 30 min.

La successiva condensazione con acido crotonico è stata effettuata mediante l'utilizzo del tubo di Schlenk che consente, mediante la ripetizione di cicli di vuoto/refill con azoto, di condurre la reazione in atmosfera condizionata ed in assenza di ossigeno. La condensazione è avvenuta secondo le condizioni di Heck, utilizzando palladio acetato come catalizzatore in presenza di trietilammina e metilpirrolidone come solvente, portando così alla formazione di un intermedio acrilico che non è stato isolato.

La reazione di Heck permette la formazione di un nuovo legame carbonio-carbonio fra un alogenuro arilico ed un alchene. L'alogenuro arilico subisce un'iniziale addizione ossidativa (OA) da parte del palladio. La successiva interazione con l'alchene consente la formazione del nuovo legame carbonio-carbonio. Quindi, attraverso le reazioni di β -eliminazione (β E) e di eliminazione riduttiva (RE), si hanno la riformazione del doppio legame e la contemporanea liberazione del catalizzatore (Figura 22).

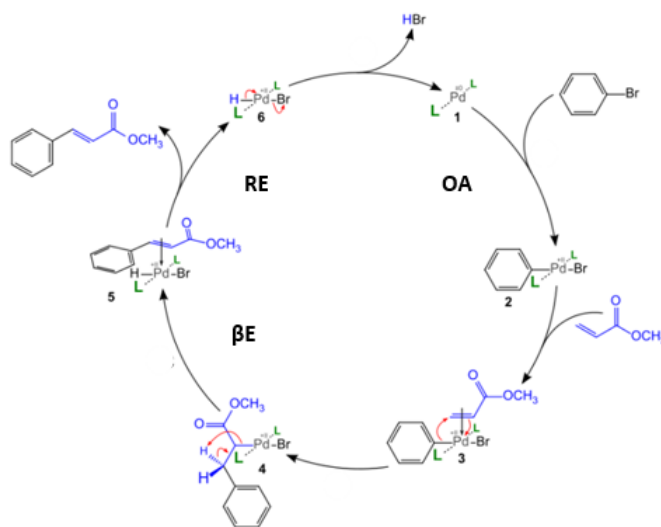


Figura 21. Meccanismo della reazione di Heck.

Come accennato, l'intermedio acrilico ottenuto dalla reazione di Heck non è stato isolato ma è stato fatto reagire direttamente con anidride acetica per permettere la ciclizzazione del sistema piridonico, ottenendo il composto **30**. Successivamente, il composto **30** è stato quindi bromurato in posizione 6 con *N*-bromosuccinimide ottenendo così il composto **31**.

Parallelamente, la 5-bromo-2-nitropiridina (**32**) è stata condensata con *N*-boc-piperazina (**19**, ottenuta come precedentemente descritto nello Schema 2) in presenza di cloruro di litio (come catalizzatore) e trietilammina in dimetilsolfossido ottenendo il composto **33**. Il gruppo nitro del composto **33** è stato poi ridotto a gruppo amminico con idrazina idrato in presenza di ferro cloruro in metanolo, ottenendo il composto **34**.

La funzione amminica del composto **34** è stata quindi attivata mediante trattamento con isopropilmagnesio cloruro in tetraidrofurano in atmosfera di azoto, consentendo così la condensazione con il composto **31**, portando all'ottenimento del composto **35**.

Per motivi di tempo, non è stato possibile terminare la sintesi di acetoni-palbociclib. Lo schema di sintesi avrebbe tuttavia previsto la condensazione della funzione acetonica, la deprotezione della funzione amminica e, infine, la condensazione con cloroacetone.

5. MATERIALI E METODI

5.1 MATERIALI

I prodotti ed i reagenti impiegati (*Apollo Scientific ed Aldrich*) sono stati utilizzati come tali, senza purificazioni.

La purezza dei solventi organici (*Carlo Erba e Lab Scan*) è di grado analitico.

I solventi deuterati utilizzati per NMR (*Isotec*) presentano grado di purezza isotopica minimo di 99,5%.

La cromatografia su strato sottile è stata effettuata su lastre al gel di silice 60F₂₅₄ (0,2 mm, *Merck*), eluendo come indicato volta per volta.

La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice 60 (0.063-0,100mm, *Merck*), eluendo con i solventi indicati volta per volta.

5.2 STRUMENTAZIONE

Per le reazioni assistite da microonde è stato utilizzato un reattore di tipo monomodale (CEM Discover) con sistema di controllo della potenza e della temperatura automatici.

Per gli spettri ¹H-NMR sono stati eseguiti con spettrometro Bruker 300-AMX, utilizzando TMS come standard interno ($\delta = 0$) ed i solventi deuterati di volta in volta indicati; i valori di assorbimento sono espressi in δ e le costanti in Hz. Gli spettri sono stati elaborati con il software MestReC 4.5.6.0.

I solventi organici sono stati evaporati con Rotavapor mod. R114 BÜCHI Labortechnik AG (Postfach, Switzerland).

5.3 METODI

5.3.1 SINTESI DI ACETONIL IMATINIB

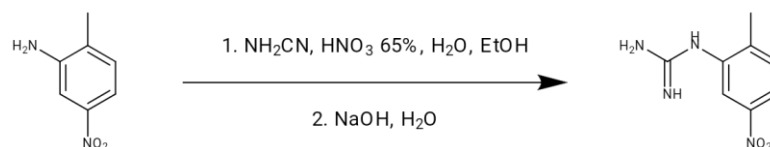
Sintesi di 3-(N,N-dimetilammino)-1-(piridin-3'-il)propen-1-one



Ad una soluzione di 3-acetilpiridina (1.1 mL, 10.0 mmoli) in xilene (4 mL) è stata aggiunta DMF-DMA (2.7 mL, 20.0 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 9:1).

La miscela di reazione è stata raffreddata e successivamente sottoposta ad evaporazione per eliminare il metanolo formatosi e la DMF-DMA. Il residuo oleoso ottenuto è stato ripreso con *n*-esano (2 mL) e lasciato sotto agitazione a temperatura ambiente. Il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione ottenendo il **3-(N,N-dimetilammino)-1-(piridin-3'-il)propen-1-one** (1.6 g, resa 95%).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 9.06 (dd, J=2.1, J=0.6, 1H, 2'-H); 8.65 (dd, J=4.7, J=2.1, 1H, 6'-H); 8.1 (dt, J=7.9, J=2.1, 1H, 4'-H); 7.84 (d, J=12.3, 1H, 2-H); 7.34 (ddd, J=7.9, J=4.7, J=0.6, 1H, 5'-H); 5.67 (d, J=12.3, 1H, 3-H); 3.17 (s, 3H, CH₃); 2.95 (s, 3H, CH₃).

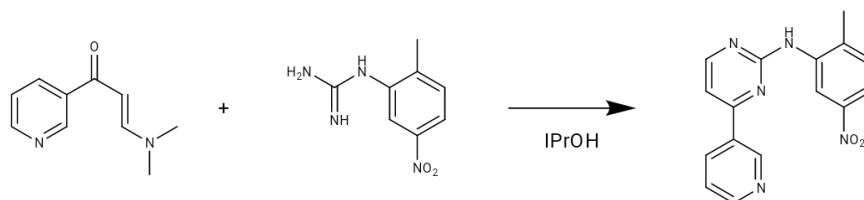
Sintesi di *N*-(2-metil-5-nitrofenil)guanidina

Ad una sospensione di 2-metil-5-nitroanilina (1.5 g, 10.0 mmoli) in EtOH (7.5 mL) sono stati aggiunti HNO_3 (0.7 mL, 10.0 mmoli) e una soluzione di cianammide (0.6 g, 15.0 mmoli) in acqua (1.5 mL). La miscela di reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione per 16 ore. Dopo raffreddamento sono stati aggiunti ulteriormente HNO_3 65% (0.7 mL, 10.0 mmoli) e la soluzione di cianammide (0.63 g, 15.0 mmoli) in acqua (1.5 mL). La miscela di reazione è nuovamente stata posta a riflusso sotto agitazione per 16 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata posta in bagno di ghiaccio ed è stato aggiunto goccia a goccia dietiletere (100 mL). La miscela è stata lasciata in agitazione fino a completa precipitazione. Il residuo solido è stato raccolto per filtrazione e disciolto in H_2O (250 mL). Alla miscela è stato aggiunto con cautela NaOH per alcalinizzare la soluzione fino a raggiungere $\text{pH} = 12$. La miscela così ottenuta è stata posta in agitazione in bagno di ghiaccio per 1 ora, portando a completa precipitazione. Il residuo insolubile formatosi è stato raccolto per filtrazione, ottenendo la *N*-(2-metil-5-nitrofenil)guanidina (1.3 g, resa 65%).

$^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$): 7.59 (dd, $J=8.1$, $J=2.4$, 1H, 4-H); 7.48 (d, $J=2.4$, 1H, 6-H); 7.30 (d, $J=8.1$, 1H, 3-H); 5.30 (s all, 4H, 2 x NH, NH_2); 2.15 (s, 3H, CH_3).

Sintesi di *N*-(2-metil-5-nitrofenil)-*N*-[4'-piridin-3''-il]pirimidin-2'-il]ammina

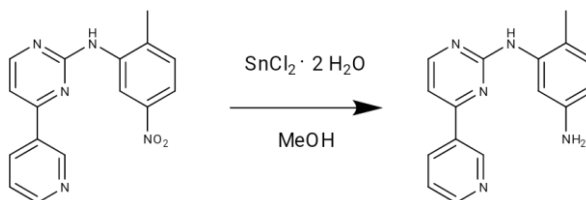


Ad una soluzione di 3-(*N,N*-dimetilammino)-1-(piridin-3'-il)propen-1-one (0.9 g, 5.0 mmoli suddivisi in 5 frazioni da 0.2 g/frazione, 1.0 mmoli/frazione) in IPrOH (10 mL; 2 mL/frazione). è stata aggiunta *N*-(2-metil-5-nitrofenil)guanidina (1.2 g, 6.0 mmoli; 0.2 g/frazione, 1.2 mmoli/frazione). La miscela di reazione è stata irradiata con microonde prima a 80 W, raggiungendo e mantenendo costante la temperatura di 100°C per 1 minuto, grazie alla regolazione automatica della potenza e del raffreddamento; in seguito a 110 W, raggiungendo e mantenendo costante la temperatura di 130°C per 10 minuti; per finire a 120 W, raggiungendo e mantenendo costante la temperatura di 150°C per 10 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH, 9:1).

Dopo raffreddamento, le frazioni sono state filtrate insieme per recuperare il precipitato formatosi che è stato quindi lavato con isopropanolo freddo, portando all'ottenimento della *N*-(2-metil-5-nitrofenil)-*N*-[4'-piridin-3''-il]pirimidin-2'-il]ammina (0.7 g, resa 47%).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 9.49 (d, *J*=2.4, 1H, 6-H); 9.27 (dd, *J*=2.3, *J*=0.6, 1H, 2''-H); 8.76 (dd, *J*=4.7, *J*=1.8, 1H, 6''-H); 8.60 (d, *J*=5.3, 1H, 6'H); 8.55 (dt, *J*=8.1, *J*=1.8, 1H, 4''-H); 7.51 (ddd, *J*=8.1, *J*=4.7, *J*=0.6, 1H, 5''-H); 7.36 (d, *J*=8.4, 1H, 3-H); 7.33 (d, *J*=5.3, 1H, 5'-H); 2.48 (s, 3H, CH₃).

Sintesi di *N*-(2-metil-5-amminofenil)-*N*-[4'-piridin-3''-il]pirimidin-2'-il]ammina

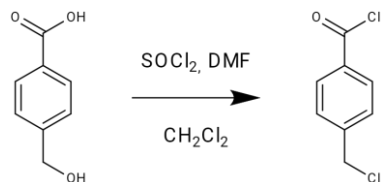


Ad una sospensione di *N*-(2-metil-5-nitrofenil)-*N*-[4'-piridin-3''-il]pirimidin-2'-il]ammina (0.6 g, 2.0 mmoli) in MeOH (20 mL) è stato aggiunto $\text{SnCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ (2.7 g, 11.9 mmoli). La reazione è stata posta a riflusso sotto agitazione per 3 ore (TLC: $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$, 9:1).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata concentrata a secchezza per eliminare il MeOH. Il residuo solido è stato ripreso con una soluzione di H_2O (63 mL) e etere etilico (32 mL), è stata aggiunta lentamente una soluzione satura di NaHCO_3 per permettere l'estrazione con etere etilico (3 x 32 mL). Infine, la fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza per ottenere la *N*-(2-metil-5-amminofenil)-*N*-[4'-piridin-3''-il]pirimidin-2'-il]ammina (0.3 g, resa 50%).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -*d*): 9.26 (dd, $J=2.3$, $J=0.7$, 1H, 2''-H); 8.72 (dd, $J=4.7$, $J=1.5$, 1H, 6''-H); 8.50 (dd, $J=8.5$, 1H, 6'-H); 8.35 (dt, $J=8.1$, $J=2.3$, 1H, 4''-H); 7.61 (d, $J=2.3$, 1H, 6-H); 7.46-7.40 (m, 1H, 5''-H); 7.15 (d, $J=5.3$, 1H, 5'-H); 7.00 (d, $J=8.1$, 1H, 3-H); 6.96 (s all, 1H, NH); 6.41 (dd, $J=8.1$, $J=2.3$, 1H, 4-H); 3.65 (s all, 2H, NH_2); 2.25 (s, 3H, CH_3).

Sintesi di acido 4-(clorometil)benzoilcloruro

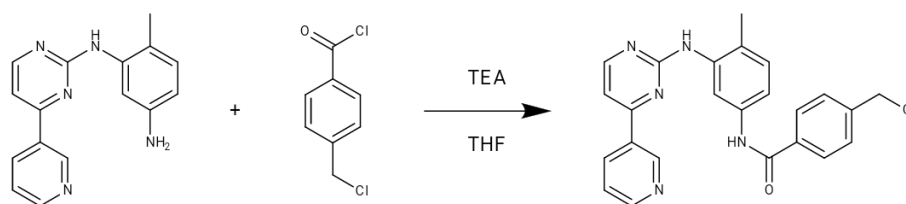


Ad una sospensione di acido 4-idrossimetilbenzoico (4.7 g, 24.7 mmoli) in CH₂Cl₂ (32 mL) sono stati aggiunti SOCl₂ (7.2 mL, 98.7 mmoli) e DMF (0.4 mL). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 18 ore (TLC: CE/EtOAc, 8:2).

Dopo raffreddamento è stato eliminato l'HCl formatosi tramite un leggero flusso d'azoto e successivamente la miscela è stata concentrata a secchezza ottenendo l'**acido 4-(clorometil)benzoil cloruro** (4,7 g, resa quantitativa).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.15-8.09 (m, 2H, 2-H e 6-H); 7.57-7.51 (m, 2H, 3-H e 5-H); 4.63 (s, 2H, CH₂).

Sintesi di 4-clorometil-N-(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''-il)pirimidin-2''-il]ammino}fenil)benzammide

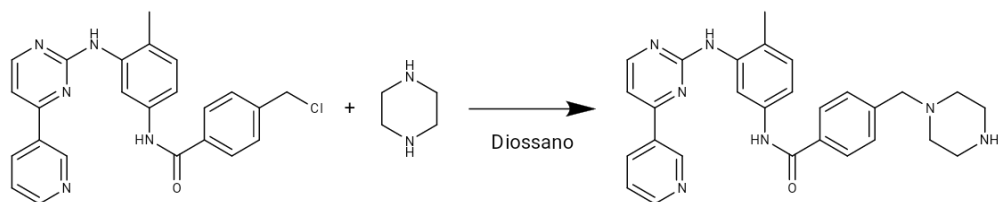


Ad una sospensione di *N*-(2-metil-5-amminofenil)-*N*-[4'-piridin-3''-il]pirimidin-2''-il]ammina (0.3 g, 1.0 mmole) in THF (5 mL) è stata aggiunta TEA (0.3 mL, 2.2 mmoli) e la miscela è stata posta in bagno di ghiaccio. È stata aggiunta goccia a goccia una soluzione fredda di acido 4-(clorometil)benzoil cloruro (0.2 g, 1.1 mmoli) in THF (2 mL). La miscela di reazione così ottenuta è stata lasciata in bagno di ghiaccio per 30 minuti, sotto costante agitazione (TLC: CHCl₃/MeOH 9:1). È stata nuovamente aggiunta goccia a goccia una soluzione fredda di acido 4-(clorometil)benzoil cloruro (70.0 mg, 1.1 mmoli) in THF (0.8 mL) e la miscela di reazione è stata lasciata ulteriori 30 minuti sotto agitazione in bagno di ghiaccio (TLC: CHCl₃/MeOH, 9:1).

La miscela di reazione è stata lentamente diluita in H₂O (20 mL) e lasciata in agitazione a temperatura ambiente fino a completa precipitazione. Il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente sospeso in acetonitrile (5 mL) fino all'ottenimento di un residuo insolubile che è stato nuovamente filtrato. Il residuo solido raccolto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CH₂Cl₂/MeOH, 95:5) ottenendo la **4-clorometil-N-(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''-il) pirimidin-2''-il]ammino}fenil)benzammide** (0.3 g, resa 81%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.22 (s all, 1H, NH); 9.27 (dd, J=2.1, J=0.9, 1H, 2''-H); 8.97 (s all, 1H, NH); 8.68 (dd, J=4.8, J=2.1, 1H, 6''-H); 8.51 (d, J=5.2, 1H, 6''-H); 8.48 (dt, J=8.2, J=2.1, 1H, 4''-H); 8.08 (d, J=2.3, 1H, 2'-H); 7.96 (d, J=8.2, 2H, 2-H e 6-H); 7.58 (d, J=8.4, 2H, 3-H e 5-H); 7.52 (ddd, J=8.2, J=4.8, J=0.9, 1H, 5''-H); 7.48 (dd, J=8.1, J=2.3, 1H, 6'-H); 7.43 (d, J=8.1, 1H, 5''-H); 7.21 (d, J=8.2, 1H, 5'-H); 4.84 (s, 2H, CH₂); 2.22 (s, 3H, CH₃).

Sintesi di *N*-[(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''')-il]pirimidin-2''-il]ammino}fenil)-4-piperazin-1-ilmetil]benzammide



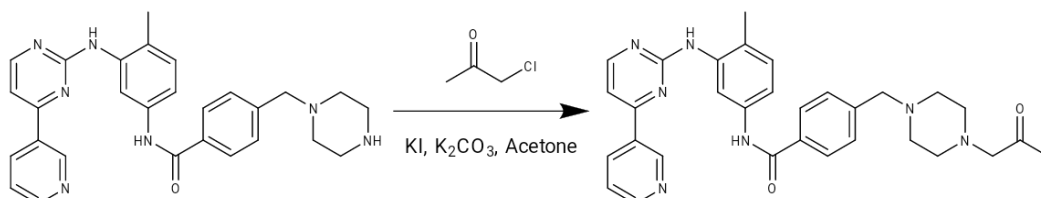
Ad una soluzione di piperazina (1.1 g, 12.4 mmoli) in diossano (3.2 mL) in fiala chiusa a 90°C è stata aggiunta 4-clorometil-*N*-(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''')-il]pirimidin-2''-il]ammino}fenil)benzammide (0.4 g, 0.8 mmoli). Le pareti del contenitore sono quindi state accuratamente lavate con ulteriore diossano (1.6 mL). La miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 90°C per 4 ore (TLC: CH₂Cl₂/EtOAc/MeOH/NH₃, 60:10:30:2).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata lentamente diluita in una soluzione acquosa satura di NaCl (88 mL) ed estratta con CH₂Cl₂ (4 x 35 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza.

Il residuo ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CH₂Cl₂/EtOAc/MeOH/NH₃, 60:20:20:2) ottenendo la *N*-[(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''')-il]pirimidin-2''-il]ammino}fenil)-4-piperazin-1-ilmetil]-benzammide (0.2 g, resa 40%).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 9.24 (dd, J=2.3, J=0.6, 1H, 2'''-H); 8.70 (dd, J=4.7, J=1.5, 1H, 6'''); 8.58 (d, J=2.3, 1H, 2'-H); 8.54-8.49 (m, 2H, 4'''H e 6''H); 7.94 (s all, 1H, NH); 7.86-7.81 (m, 2H, 2-H e 6-H); 7.47-7.39 (m, 3H, 3-H, 5-H e 5'''-H); 7.30 (dd, J=8.3, J=2.3, 1H, 6'-H); 7.21 (d, J=7.9, 1H, 5'-H); 7.18 (d, J=5.1, 1H, 5''-H); 7.06 (s all, 1H, NH); 3.55 (s, 2H, CH₂); 2.93 (t, 4H, 2 x CH₂ della piperazina); 2.46 (t, 4H, 2 x CH₂ della piperazina); 2.35 (s, 3H, CH₃).

Sintesi di *N*-[(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''')-il]pirimidin-2''-il]ammino}fenil)-4-(4'''-acetometil)-piperazin-1-ilmetil]benzammide (Ace-Ima)



Ad una soluzione di *N*-[(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''')-il]pirimidin-2''-il]ammino}fenil)-4-piperazin-1-ilmetil]benzammide (0.2 g, 0.3 mmoli) in acetone (1.3 mL) sono stati aggiunti K_2CO_3 (51 mg, 0.4 mmoli), cloroacetone (29.0 μ L, 0.4 mmoli) e KI (61 mg, 0.4 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: CH_2Cl_2 /EtOAc/MeOH/ NH_3 , 60:10:30:2).

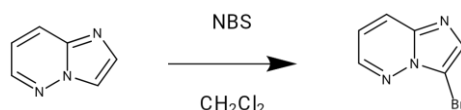
Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata lentamente diluita in una soluzione acquosa satura di NaCl (31 mL) ed estratta con CH_2Cl_2 (4 x 35 mL). La fase organica è quindi stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza.

Il residuo ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CH_2Cl_2 /MeOH, 95:5) ottenendo la ***N*-[(4'-metil-3'-{[4''-(piridin-3''')-il]pirimidin-2''-il]ammino}fenil)-4-(4'''-acetometil)-piperazin-1-ilmetil]benzammide (Ace-Ima)**.

1H -NMR ($CDCl_3$ -*d*): 9.25 (dd, $J=2.1$, $J=0.8$, 1H, 2'''-H); 8.72 (dd, $J=4.9$, $J=1.5$, 1H, 6'''-H); 8.60 (d, $J=2.2$, 1H, 2'-H); 8.56-8.51 (m, 2H, 4'''-H e 6''-H); 7.90-7.84 (m, 2H, 2-H e 6-H); 7.82 (s all, 1H, NH); 7.44 (ddd, $J=7.9$, $J=4.9$, $J=0.8$, 1H, 5'''-H); 7.31 (dd, $J=7.9$, $J=2.2$, 1H, 6'-H); 7.22 (d, $J=7.9$, 1H, 5'-H); 7.18 (d, $J=5.3$, 1H, 5''-H); 7.03 (s all, 1H, NH); 3.67 (s, 2H, CH_2); 3.25 (s, 2H, CH_2); 2.85-2.40 (t, 8H, 4 x CH_2 della piperazina); 2.36 (s, 3H, CH_3); 2.15 (s, 3H, CH_3).

5.3.2 SINTESI DI ACETONIL-PONATINIB

*Sintesi di 3-bromoimidazo[1,2-*b*]piridazina*

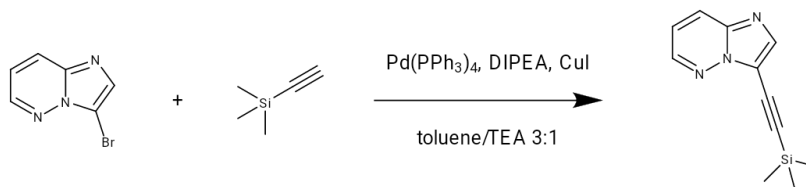


Ad una soluzione di imidazo[1,2-*b*]piridazina (1.2 g, 10.0 mmoli) in CH₂Cl₂ (30 mL) posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta *N*-bromosuccinimide (2.8 g, 16.0 mmoli). La miscela di reazione è rimasta sotto agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti e successivamente è stata posta a riflusso per 1 ora (TLC: CHCl₃/MeOH, 95:5).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata lavata con una soluzione acquosa 0.5 M di Na₂CO₃ (6 x 50 mL). La fase organica è quindi stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza portando all'ottenimento della **3-bromoimidazo[1,2-*b*]piridazina** (1.5 g, resa 75%).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.48 (dd, J=4.3, J=1.7, 1H, 6-H); 7.97 (dd, J=9.3, J=1.7, 1H, 8-H); 7.80 (s, 1H, 2-H); 7.11 (dd, J=9.3, J=4.3, 1H, 7-H).

Sintesi di 3-[(trimetilsilil)etinil]imidazo[1,2-*b*]piridazina



Ad una soluzione di toluene/TEA 3:1 (12 mL), precedentemente degasata mediante sonicazione, sono stati aggiunti 3-bromoimidazo[1,2-*b*]piridazina (0.8 g, 4.0 mmoli), Pd(PPh₃)₄ (0.2 g, 0.2 mmoli), CuI (0.2 g, 1.2 mmoli), DIPEA (1.0 mL, 6.0 mmoli) ed in fine etiniltrimetilsilano (0.7 mL, 4.8 mmoli).

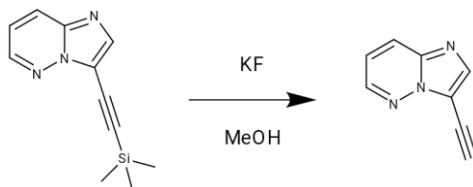
La miscela di reazione così ottenuta è stata posta in atmosfera inerte tramite flusso di azoto e lasciata sotto costante agitazione a temperatura ambiente per 72 ore (TLC: CE/EtOAc, 4:6).

La miscela di reazione è stata diluita in una soluzione acquosa satura di NH₄Cl (150 mL) ed estratta con EtOAc (300 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza.

Il residuo è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CE/EtOAc, 7:3) ottenendo la **3-[(trimetilsilil)etinil]imidazo[1,2-*b*]piridazina** (0.47 g, resa 66%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.67 (dd, J=4.5, J=1.5, 1H, 6-H); 8.21 (dd, J=9.1, J=1.5, 1H, 8-H); 8.12 (s, 1H, 2-H); 7.35 (dd, J=9.1, J=4.5, 1H, 7-H); 0.3 (s, 9H, Si(CH₃)₃).

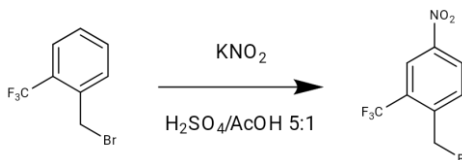
Sintesi di 3-etinilimidazo[1,2-*b*]piridazina



Ad una soluzione di 3-[(trimetilsilil)etinil]imidazo[1,2-*b*]piridazina (0.5 g, 2.1 mmoli) in MeOH (3 mL) è stata aggiunta una soluzione satura di KF in MeOH (0.8 mL). La reazione è stata posta a temperatura ambiente per 1 ora (TLC: CE/EtOAc, 4:6).

La miscela di reazione è stata diluita in una soluzione acquosa satura di NaCl (55 mL) ed estratta con CH₂Cl₂. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza portando all'ottenimento della **3-etinilimidazo[1,2-*b*]piridazina** (0.3 g, resa quantitativa).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.48 (dd, J=4.5, J=1.7, 1H, 6-H); 8.02 (s, 1H, 2-H); 8.00 (dd, J=9.2, J=1.7, 1H, 8-H); 7.14 (dd, J=9.2, J=4.5, 1H, 7-H); 3.80 (s, 1H, ≡CH).

Sintesi di 4-nitro-2-trifluorometilbenzilbromuro

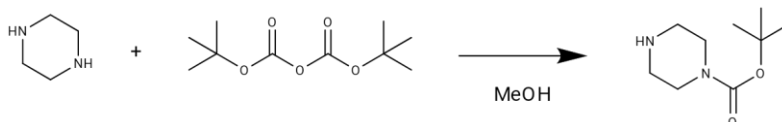
Ad una soluzione di 2-trifluorometilbenzil bromuro (1.2 g, 5.0 mmoli) in H₂SO₄/AcOH 5:1 (6 mL) posta in agitazione in bagno di ghiaccio, è stato aggiunto lentamente a porzioni KNO₃ (0.6 g, 5.5 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta è stata posta a temperatura ambiente sotto costante agitazione per 1 ora (TLC: CE/CHCl₃, 5:5).

La miscela di reazione è quindi stata diluita con cautela in una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ e ghiaccio (150 mL) ed estratta con CH₂Cl₂ (3 x 60 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ concentrata a secchezza.

Il residuo liquido ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CE/EtOAc, 95:5) portando all'ottenimento del **4-nitro-2-trifluorometilbenzil bromuro** (1,1 g, resa 80%).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.53 (d, J=2.4, 1H, 3-H); 8.41 (dd, J=8.5, J=2.4, 1H, 5-H); 7.83 (d, J=8.5, 1H, 6-H); 4.66 (s, 2H, CH₂Br).

Sintesi di 1-tertbutossicarbonilpiperazina

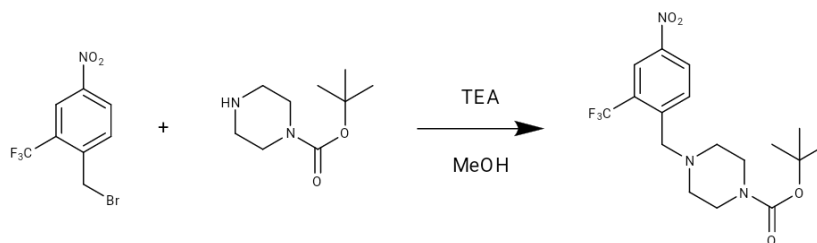


Ad una soluzione di piperazina (5.2 g, 60.0 mmoli) in MeOH (200 mL) è stata aggiunta, sotto costante agitazione, goccia a goccia una soluzione di di-tertbutildicarbonato in MeOH (20 mL). La miscela di reazione è rimasta sotto agitazione costante a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 9:1). La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza e il residuo formatosi ripreso con EtOAc (200 mL). La fase organica è stata lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl (3 x 50 mL), successivamente anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza.

Il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice, eluendo prima con CH₂Cl₂ 100% fino a completa eliminazione della 1,4-(di-tertbutildicarbonato)piperazina e quindi con MeOH 100%, portando all'ottenimento della **1-tertbutossicarbonilpiperazina** (2.1 g, resa 55%).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 3.38 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 2.80 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃).

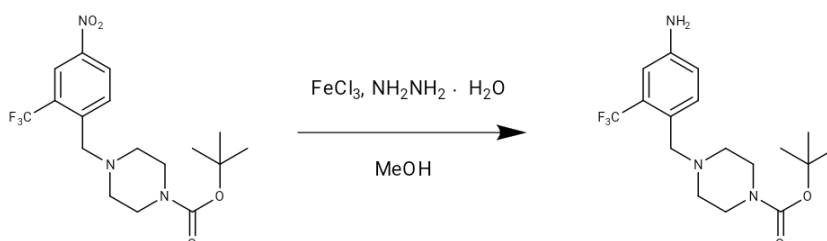
**Sintesi di 4-(4'-nitro-2'-trifluorometilbenzil9-1-
tertbutossicarbonilpiperazina**



Ad una soluzione di 4-nitro-2-trifluorometilbenzil bromuro (0.9 g, 3.0 mmoli) in CH_2Cl_2 (9 mL) sono stati aggiunti TEA (0.9 mL, 6.1 mmoli) e 1-tertbutossicarbonilpiperazina (1.1 g, 6.0 mmoli). La miscela di reazione è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 2.5 ore (TLC: CE/ CHCl_3 , 5:5). La miscela di reazione è stata diluita in EtOAc (80 mL) e successivamente lavata con una soluzione acquosa satura di NaHCO_3 (2 x 40 mL) ed una soluzione acquosa satura di NH_4Cl (3 x 53 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza portando all'ottenimento della **4-(4'-nitro-2'-trifluorometilbenzil9-1-tertbutossicarbonilpiperazina** (1.1 g, resa quantitativa).

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 -d): 8.51 (d, $J=2.3$, 1H, 3'-H); 8.38 (dd, $J=8.5$, $J=2.3$, 1H, 5'-H); 8.11 (d, $J=8.7$, 1H, 6'-H); 3.75 (s, 2H, CH_2N); 3.46 (t, $J=4.9$, 4H, 2 x CH_2); 2.44 (t, $J=4.9$, 4H, 2 x CH_2); 1.46 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$).

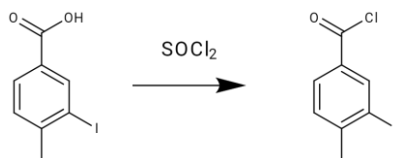
**Sintesi di 4-(4'-ammino-2'-trifluorometilbenzil)-1-
tertbutossicarbonil-piperazina**



Ad una soluzione di 4-(4'-nitro-2'-trifluorometilbenzil)-1-tertbutossicarbonilpiperazina (1.1 g, 2.9 mmoli) in MeOH (18 mL) sono stati aggiunti FeCl₃ (0.4 g, 2.3 mmoli) e NH₂NH₂ · H₂O (8.5 mL, 176.6 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta è stata posta a riflusso per 1.5 ore sotto agitazione (TLC: CHCl₃/MeOH, 95/5).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita con cautela in una soluzione satura di NH₄Cl (80 mL), alcalinizzata fino a pH = 9 con ammoniaca ed estratta con EtOAc (3 x 50 mL). La fase organica è quindi stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza ottenendo la **4-(4'-ammino-2'-trifluorometilbenzil)-1-tertbutossicarbonil-piperazina** (1.0 g, resa quantitativa).

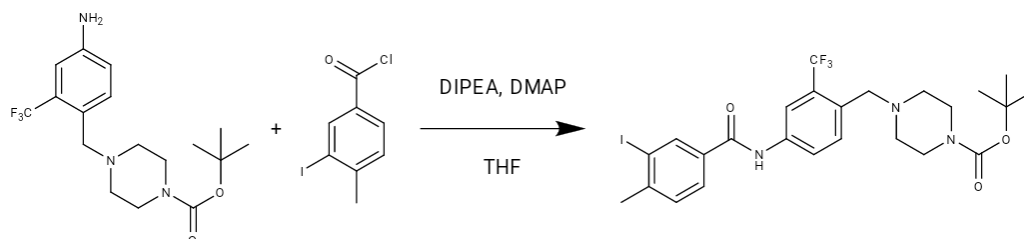
¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.47 (d, J=8.4, 1H, 6'-H); 6.92 (d, J=2.2, 1H, 3'-H); 6.79 (dd, J=8.4, J=2.2, 1H, 5'-H); 3.77 (s all, 2H, NH₂); 3.52 (s, 2H, CH₂N); 3.41 (t, J=4.8, 4H, 2 x CH₂); 2.38 (t, J=4.8, 4H, 2 x CH₂); 1.45 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Sintesi di 3-iodo-4-metilbenzoil cloruro

Una soluzione di acido 3-iodo-4-metilbenzoico (0.7 g, 2.5 mmoli) in SOCl₂ (5 mL) è stata posta a refluxo sotto agitazione per 3 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 9:1).

Dopo raffreddamento, la soluzione è stata trattata con flusso d'azoto per permettere l'eliminazione dell'HCl formatosi durante la reazione. Successivamente, è stata concentrata a secchezza ottenendo il **3-iodo-4-metilbenzoil cloruro** (0.7 g, resa quantitativa) che, essendo un prodotto molto instabile è stato immediatamente utilizzato nello step successivo senza ulteriori purificazioni.

Sintesi di *N*-[3'-trifluorometil-4'-(4''-tertbutossicarbonilpiperazin-1''-il)metilfenil]-3-iodo-4-metilbenzammide



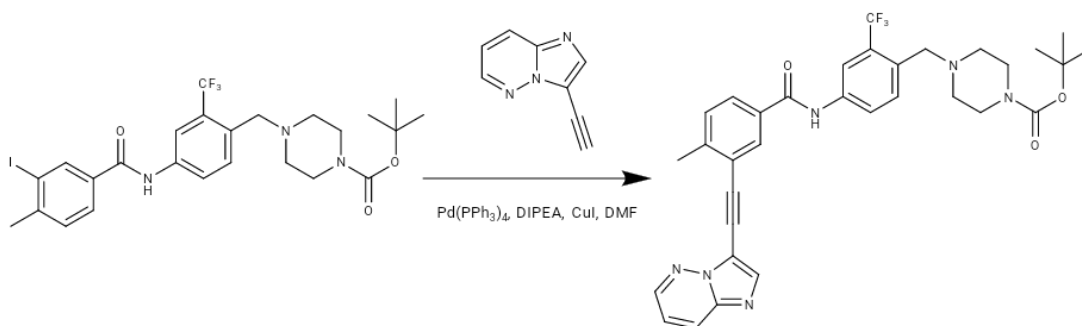
Una soluzione di 3-iodo-4-metilbenzoil cloruro (2.7 g, 2.0 mmoli) in THF (4 mL) è stata aggiunta goccia a goccia ad una soluzione di 4-(4'-ammino-2'-trifluorometilbenzil)-1-tertbutossicarbonilpiperazina (0.7 g, 1.9 mmoli), DIPEA (0.8 mL, 4.8 mmoli) e DMAP (0.5 mg, 3.8 μ m) in THF (4 mL). La miscela di reazione così ottenuta è stata lasciata sotto agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 95:5).

La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza e il residuo formatosi ripreso con EtOAc (80 mL). Successivamente, la soluzione è stata lavata con una soluzione acquosa satura di NaCl (2 x 40 mL) e con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (3 x 40 mL). La fase organica è quindi stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza.

Il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CHCl₃) ottenendo la *N*-[3'-trifluorometil-4'-(4''-tertbutossicarbonilpiperazin-1''-il)metilfenil]-3-iodo-4-metilbenzammide (0.6 g, resa 54%)

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.30 (d, J= 1.9, 1H, 2-H); 7.90-7.73 (m, 5H, 5-H, 6-H, NH, 2'-H e 6'-H); 7.35 (d, J=8.1, 1H, 5'-H); 3.63 (s, 2H, CH₂); 3.44 (t, 4H, 2 x CH₂); 2.50 (s, 3H, 4-CH₃); 2.41 (t, 4H, 2 x CH₂); 1.46 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Sintesi di *N*-[3'-trifluorometil-4'-(4''-tertbutossicarbonilpiperazin-1''-il)metilfenil]-3-(imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etinil-4-metilbenzammide



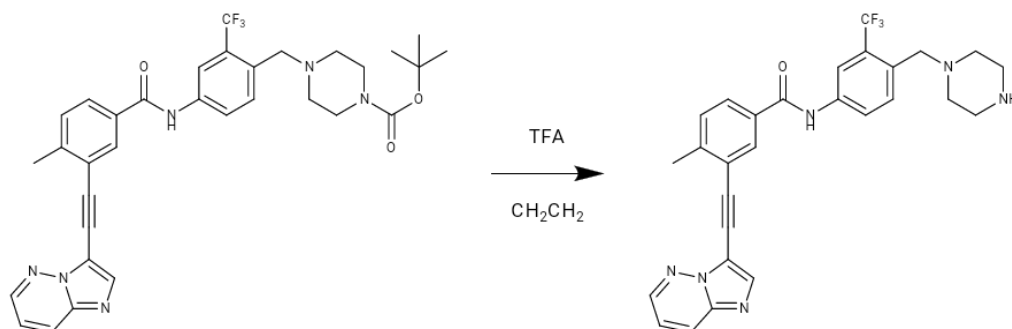
I solidi *N*-[3'-trifluorometil-4'-(4''-tertbutossicarbonilpiperazin-1''-il)metilfenil]-3-iodo-4-metilbenzammide (0.6 g, 1.0 mmoli), 3-etinylimidazo[1,2-*b*]piridazina (0.2 g, 1.2 mmoli), Pd(PPh₃)₄ (53 mg, 46 μmoli) e CuI (26 mg, 68 μmoli) sono stati posti in agitazione in atmosfera d'azoto per 15 minuti. Successivamente, sono state aggiunte DMF (6 mL) e DIPEA (0.2 mL, 1.4 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta è stata lasciata in atmosfera d'azoto a temperatura ambiente per 24 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 99:1).

La miscela di reazione è stata diluita in una soluzione acquosa satura di NH₄Cl (40 mL) e mantenuta in agitazione fino all'ottenimento di un precipitato che è stato successivamente raccolto per filtrazione.

Il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CHCl₃) ottenendo la ***N*-[3'-trifluorometil-4'-(4''-tertbutossicarbonilpiperazin-1''-il)metilfenil]-3-(imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etinil-4-metilbenzammide** (0.3 g, resa 44%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.58 (s, 1H, NH); 8.72 (dd, J=4.5, J=1.5, 1H, 6''-H); 8.27-8.19 (m, 4H, 2-H, 6-H, 2''-H e 2'-H); 8.06 (dd, J=8.5, J=1.8, 1H, 8''-H); 7.94 (dd, J=7.9, J=1.8, 1H, 6'-H); 7.76 (m, 1H, 5-H); 7.55 (d, J=8.5, 1H, 5'-H); 7.39 (dd, J=8.9, J=4.5, 1H, 7''-H); 3.50 (t, J=4.5, 4H, 2 x CH₂); 3.33 (s, 2H, CH₂); 2.60 (s, 3H, 4-CH₃); 2.34 (t, J=4.5, 4H, 2 x CH₂); 1.39 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Sintesi di *N*-[3'-trifluorometil-4'-(piperazinil)metilfenil]-3-imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etnil-4-metilbenzammide

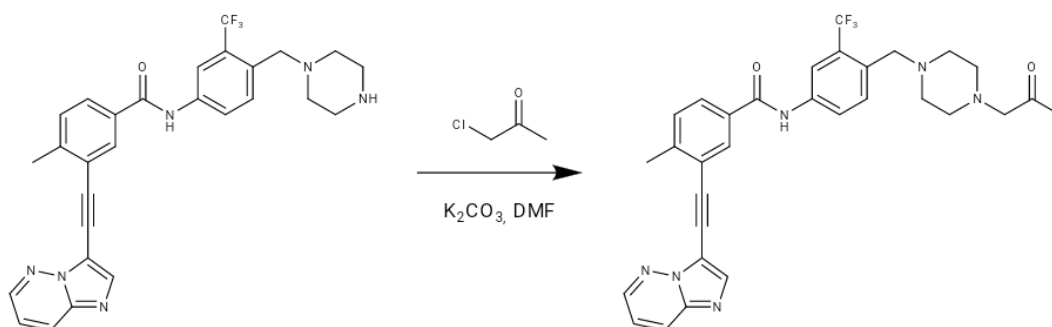


Ad una soluzione di *N*-[3'-trifluorometil-4'-(4''-tertbutossicarbonilpiperazin-1''-il)metilfenil]-3-(imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etnil-4-metilbenzammide (0.3 g, 0.4 mmoli) in CH₂CH₂ (19 mL) è stato aggiunto TFA (1 mL). La miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 5 ore (TLC: CE/EtOAc, 4:6).

La miscela di reazione è stata concentrata a secchezza ottenendo un residuo oleoso che è stato ripreso con EtOAc (20 mL) e lavato con una soluzione satura di NaHCO₃ (3 x 10 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la *N*-[3'-trifluorometil-4'-(piperazinil)metilfenil]-3-imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etnil-4-metilbenzammide (0.2 g, resa quantitativa).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.56 (s, 1H, NH); 8.72 (dd, J=4.5, J=1.5, 1H, 6''-H); 8.27-8.18 (m, 4H, 2-H, 6-H, 2'-H e 2''-H); 8.05 (dd, J= 9.0, J=1.7, 1H, 8''-H); 7.94 (dd, J=8.91, J=1.8, 1H, 6'-H); 7.75-7.65 (m, 1H, 5-H); 7.55 (d, J=8.1, 1H, 5'-H); 7.39 (dd, J=9.0, J=4.5, 1H, 7''-H); 3.33 (s, 2H, CH₂); 2.72 (t, 4H, 2 x CH₂); 2.61 (s, 3H, 4-CH₃); 2.33 (t, 4H, 2 x CH₂).

Sintesi di *N*-[3'-trifluorometil-4'-(4'''-acetonil-piperazin-1''-il)metilfenil]-3-(imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etiril-4-metilbenzammide (Ace-Pon)



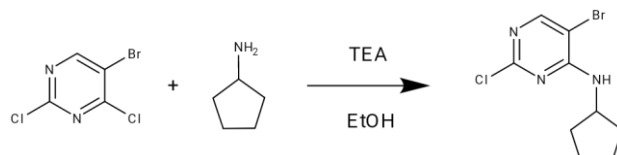
Ad una soluzione di *N*-[3'-trifluorometil-4'-(piperazinil)metilfenil]-3-imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etiril-4-metilbenzammide (0.1 g, 0.2 mmoli) in DMF (3 mL) è stato aggiunto K_2CO_3 (27 mg, 0.2 mmoli). Dopo aver lasciato la sospensione in agitazione a temperatura ambiente per 10 minuti è stato aggiunto cloroacetone (19 μ L, 0.2 mmoli) e la miscela di reazione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 1.5 ore. Successivamente, è stato ulteriormente aggiunto cloroacetone (19 μ L, 0.2 mmoli) e la miscela di reazione è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: $CHCl_3/MeOH$, 9:1).

La miscela di reazione è stata lentamente versata in una soluzione acquosa satura di NaCl (20 mL) ed estratta con EtOAc (3 x 10 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na_2SO_4 e concentrata a secchezza portando all'ottenimento di *N*-[3'-trifluorometil-4'-(4'''-acetonil-piperazin-1''-il)metilfenil]-3-(imidazo[1,2-*b*]piridazin-3''-il)etiril-4-metilbenzammide (0.1 g, resa 90%).

1H -NMR ($CDCl_3$ -*d*): 8.49 (dd, $J=4.3$, $J=1.5$, 1H, 6''-H); 8.15 (s all, 1H, NH); 8.10-7.86 (m, 6H, 2-H, 6-H, 2'-H, 5'-H, 2''-H, 8''-H); 7.83 (dd, $J=7.9$, $J=1.9$, 1H, 6'-H); 7.40 (d, $J=7.9$, 1H, 5-H); 7.14 (dd, $J=9.1$, $J=4.3$, 1H, 7''H); 3.68 (s, 2H, CH_2).

5.3.3 SINTESI DI ACETONIL-PALBOCICLIB

Sintesi di 5-bromo-2-cloro-6-(ciclopentil)amminopirimidina



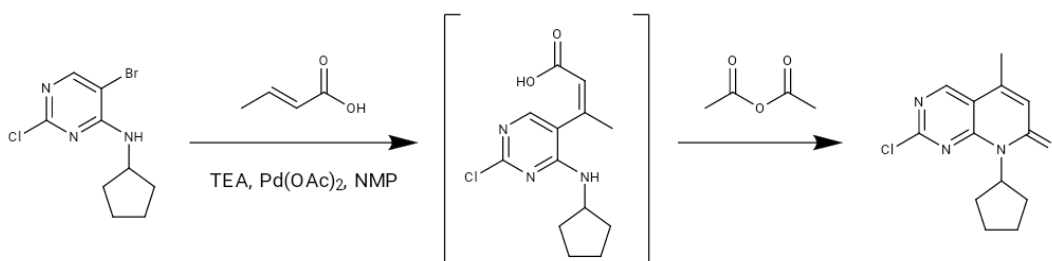
Ad una soluzione di 5-bromo-2,4-dicloropirimidina (0.6 g, 4.0 mmoli) e TEA (0.6 mL, 4.0 mmoli) in EtOH (3 mL) in bagno di ghiaccio è stata lentamente aggiunta ciclopentilammina (0.5 mL, 5.0 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 2 ore (TLC: CE/EtOAc, 8:2).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita in H₂O (30 mL) ed estratta con CHCl₃ (3 x 10 mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza.

Il residuo solido ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: n-esano/EtOAc, 9:1) ottenendo la **5-bromo-2-cloro-6-(ciclopentil)amminopirimidina** (0.9 g, resa 78%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 8.49 (s, 1H, 4-H); 8.43 (s all, 1H, NH); 4.45-4.33 (quint, 1H, CH-ciclopentile); 1.76-1.39 (m, 8H, 4 x CH₂-ciclopentile).

Sintesi di 8-ciclopentil-2-cloro-5-metilpirido[5,6-*e*]pirimidin-7-(8H)-one

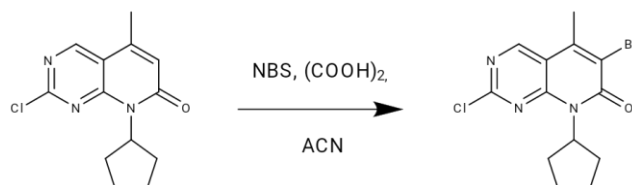


Ad una soluzione di 5-bromo-2-cloro-6-(ciclopentil)amminopirimidina (0.1 g, 0.5 mmoli) in NMP (0.7 mL) sono stati aggiunti acido crotonico (65 mg, 0.8 mmoli) e TEA (0.3 mL, 2.0 mmoli). La soluzione così ottenuta è stata sottoposta a tre cicli di vuoto e refill con azoto. Alla miscela è stato aggiunto Pd(OAc)₂ (1 mg, 0.3 mmoli) e la miscela di reazione è stata sottoposta nuovamente a tre cicli di vuoto e refill con azoto. La miscela di reazione è stata posta sotto agitazione ad una temperatura di 65°C per 16 ore (TLC: CE/EtOAc, 6:4). Quindi è stata aggiunta anidride acetica (94 µL, 1.0 mmole) e la miscela di reazione è stata mantenuta sotto agitazione a 65°C per 2 ore (TLC: CE/EtOAc, 6:4).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita in H₂O (10 mL) e lasciata in agitazione fino a completa precipitazione. Il residuo solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CE/EtOAc, 8:2) portando all'ottenimento del **8-ciclopentil-2-cloro-5-metilpirido[5,6-*e*]pirimidin-7-(8H)-one** (83 mg, resa 64%).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.74 (s, 1H, 4-H); 6.54 (s, 1H, 6-H); 5.58 (quint, J=8.9, 1H, CH-ciclopentile); 2.45 (s, 3H, CH₃); 2.32 (m, 8H, 4 x CH₂).

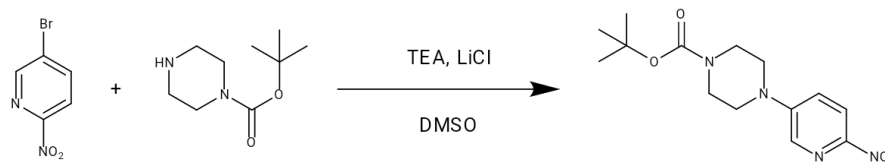
Sintesi di 6-bromo-8-ciclopentil-2-cloro-5-metilpirido[5,6-*e*]pirimidin-7-(8H)-one



Ad una soluzione di 8-ciclopentil-2-cloro-5-metilpirido[5,6-*e*]pirimidin-7-(8H)-one (68 mg, 0.3 mmoli) in ACN (2 mL) sono stati aggiunti *N*-bromosuccinimide (68 mg, 0.4 mmoli) e acido ossalico (7 mg, 50 μ moli). La miscela di reazione così ottenuta è stata posta sotto agitazione ad una temperatura di 60°C per 24 ore (TLC: CE/EtOAc, 5:5).

Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata aggiunta di H₂O (0.2 mL) portando alla formazione di un precipitato. La sospensione è quindi stata aggiunta ad una soluzione di sodio solfito (34 mg) in acqua (2 ml) e lasciata in agitazione per 1 ora. Il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e lavato con H₂O, ottenendo il **6-bromo-8-ciclopentil-2-cloro-5-metilpirido[5,6-*e*]pirimidin-7-(8H)-one** (70 mg, resa 76%).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.86 (s, 1H, 4-H); 6.04-5.91 (m, 1H, CH-ciclopentile); 2.67 (s, 3H, CH₃); 2.29-1.61 (m, 8H, 4 x CH₂).

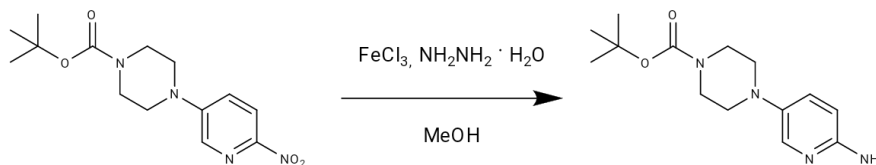
Sintesi di 5-(4'-tert-butilossicarbonilpiperazino)-2-nitropiridina

Ad una soluzione di 5-bromo-2-nitropiridina (0.7 g, 3.4 mmoli) in DMSO (8.5 mL) sono stati aggiunti 1-tertbutossicarbonilpiperazina (1.3 g, 6.8 mmoli), TEA (0.7 mL, 5.1 mmoli) e LiCl (1.4 g, 3.4 mmoli). La miscela di reazione così ottenuta è stata posta sotto agitazione a 65°C per 16 ore (TLC: CHCl₃/MeOH, 99:1).

Alla miscela di reazione è stata aggiunta H₂O (10 mL) ed è stata mantenuta in agitazione a 65°C per 1 ora e lasciata a temperatura ambiente per 3 ore. Il precipitato ottenuto è stato raccolto per filtrazione portando all'ottenimento della **5-(4'-tert-butilossicarbonilpiperazino)-2-nitropiridina** (0.24 g, resa 23%).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.19 (d, J=9.2, 1H, 3-H); 8.13 (d, J=3.0, 1H, 6-H); 7.20 (dd, J=9.2, J=3.0, 1H, 4-H); 3.64 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 3.50 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 1.49 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Sintesi di 5-(4'-tert-butilossicarbonilpiperazino)-2-amminopiridina

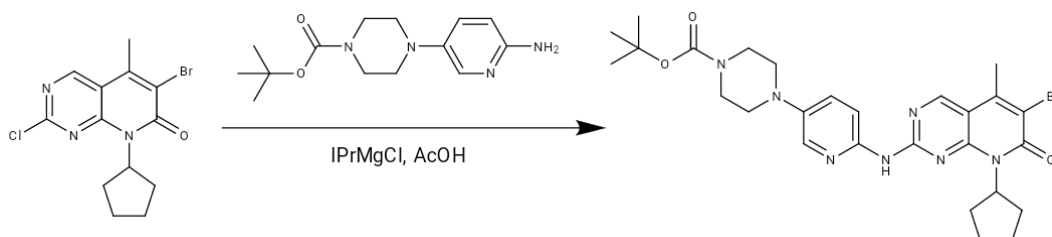


Ad una sospensione di 5-(4'-tert-butilossicarbonilpiperazino)-2-nitropiridina (0.2 g, 0.8 mmoli) in MeOH (5 mL) sono stati aggiunti FeCl₃ (0.1 g, 0.6 mmoli) e NH₂NH₂ · H₂O (2.4 mL, 48.5 mmoli). La miscela di reazione è stata posta a riflusso per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH, 9:1). Dopo raffreddamento, la miscela di reazione è stata diluita in una soluzione acquosa di NaCl e NH₃ e lasciata in agitazione per 16 ore. La soluzione è stata estratta con EtOAc (3 x 25 mL) e la fase organica anidrificata con Na₂SO₄ è stata concentrata a secchezza.

Il residuo ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (eluente: CHCl₃/MeOH, 97:3) ottenendo la **5-(4'-tert-butilossicarbonilpiperazino)-2-amminopiridina** (0.2 g, resa 84%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 7.61 (d, J=2.9, 1H, 6-H); 7.17 (dd, J=8.8, J=3.3, 1H, 4-H); 6.40 (d, J=8.8, 1H, 3-H); 5.42 (s all, 2H, NH); 3.42 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 2.85 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 1.41 (s, 9H, C(CH₃)₃).

Sintesi di *N*-[5-(4'-*tert*-butilossicarbonilpiperazino)piridin-2-il]-*N*-(6''-bromo-8''-ciclopentil-5''-metilpirido[5,6-*e*]pirimidin-7''(8''H)-one-2''-il)amina



Una soluzione di 5-(4'-*tert*-butilossicarbonilpiperazino)-2-amminopiridina (0.2 g, 0.7 mmoli) in THF (5 mL) è stata lasciata in agitazione per 30 minuti in atmosfera d'azoto. Successivamente, è stato aggiunto lentamente nell'arco di 30 minuti IPrMgCl 2M in THF (0.3 mL) e la miscela è stata lasciata in agitazione a 20 °C per 40 minuti. A questa soluzione, è stato aggiunto 6-bromo-8-ciclopentil-2-cloro-5-metilpirido[5,6-*e*]pirimidin-7-(8H)-one (0.2 g, 0.5 mmoli) e la miscela di reazione così ottenuta è stata posta in atmosfera d'azoto a 60 °C per 90 minuti, a temperatura ambiente per 16 ore, riscaldata lentamente a 45 °C e, infine, lasciata a reflusso in agitazione per 30 minuti (TLC: CHCl₃/MeOH, 95:5).

Dopo raffreddamento, alla miscela è stata aggiunta una soluzione di acido acetico (30 µL) in THF (2 mL) e la miscela così ottenuta è stata mantenuta in agitazione per 6 ore. Il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente lavato con H₂O (1 mL) e con acetone (1 mL) ottenendo la *N*-[5-(4'-*tert*-butilossicarbonilpiperazino) piridin-2-il] -*N*-(6''-bromo-8''-ciclopentil-5''-metilpirido [5,6-*e*]pirimidin-7''(8''H)-one-2''-il)amina.

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.78 (s, 1H, NH); 8.18 (d, J=9.2, 1H, 3-H); 8.03 (d, J=2.9, 1H, 6-H); 7.86 (s, 1H, 4-H); 7.33 (dd, J=9.2, J=2.9, 1H, 4-H); 5.98 (quint, J=8.8, 1H, CH-ciclopentile); 3.61 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 3.12 (t, J=5.1, 4H, 2 x CH₂); 2.61 (s, 3H, 5-CH₃); 1.54 (s, 9H, C(CH₃)₃).

6. BIBLIOGRAFIA

1. Cancer. Available at: <https://www.who.int/health-topics/cancer>.
2. Motofei, I. G. Biology of Cancer; From Cellular Cancerogenesis to Supracellular Evolution of Malignant Phenotype. *Cancer Investigation* **36**, 309–317 (2018).
3. Celotti, F. *Patologia generale e fisiopatologia*. (2013).
4. Handbook of Cancer Chemotherapy - Google Libri. Available at: <https://books.google.it/books?id=CG8HLvx3IIAC&pg=PA53&lpg=PA53&dq=antineoplastic+drug+classification&source=bl&ots=C5VXQqhUqP&sig=j8RmWCo9zaOi8YOzLkYLvrbvxMs&hl=it&sa=X&ei=hzjVUuDzIMPkywPin4DQDA#v=onepage&q=antineoplasticdrugclassification&f=false>. (Accessed: 7th September 2019)
5. Definition of targeted therapy - NCI Dictionary of Cancer Terms - National Cancer Institute. Available at: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/targeted-therapy?redirect=true>.
6. Bahrami, B. *et al.* Nanoparticles and targeted drug delivery in cancer therapy. *Immunology Letters* **190**, 64–83 (2017).
7. Fabbro, D. *et al.* Protein kinases as targets for anticancer agents: From inhibitors to useful drugs. in *Pharmacology and Therapeutics* **93**, 79–98 (2002).
8. Ptacek, J. *et al.* Global analysis of protein phosphorylation in yeast. *Nature* **438**, 679–684 (2005).
9. Shchemelinin, I., Šefc, L. & Nečas, E. Protein kinases, their function and implication in cancer and other diseases. *Folia Biol. (Praha)*. **52**, 81–101 (2006).
10. Madhusudan, S. & Ganesan, T. S. Tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Clinical Biochemistry* **37**, 618–635 (2004).
11. Fehm, T. *et al.* Prognostic significance of serum HER2 and CA 15-3 at the time of diagnosis of metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* **24**, 1987–92
12. Deininger, M. W. *et al.* Nilotinib product information. *Blood* **18**, 31–43 (2015).

13. Krause, D. S. & Van Etten, R. A. Tyrosine kinases as targets for cancer therapy. *New England Journal of Medicine* **353**, 172–187 (2005).
14. Lee, C. H. *et al.* A single amino acid in the SH3 domain of Hck determines its high affinity and specificity in binding to HIV-1 Nef protein. *EMBO J.* **14**, 5006–15 (1995).
15. Gocek, E., Moulas, A. N. & Studzinski, G. P. Non-receptor protein tyrosine kinases signaling pathways in normal and cancer cells. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **51**, 125–137 (2014).
16. Tan, A. C., Vyse, S. & Huang, P. H. Exploiting receptor tyrosine kinase co-activation for cancer therapy. *Drug Discovery Today* **22**, 72–84 (2017).
17. Lozzio CB, L. B. Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. *Blood* **128**, 1995 (2016).
18. Colicelli, J. ABL tyrosine kinases: Evolution of function, regulation, and specificity. *Sci. Signal.* **3**, 1–42 (2010).
19. Ren, R. Mechanisms of BCR-ABL in the pathogenesis of chronic myelogenous leukaemia. *Nature Reviews Cancer* **5**, 172–183 (2005).
20. Quintás-Cardama, A. & Cortes, J. Molecular biology of bcr-abl1-positive chronic myeloid leukemia. *Blood* **113**, 1619–1630 (2009).
21. Reddy, E. P. & Aggarwal, A. K. The Ins and Outs of Bcr-Abl Inhibition. *Genes and Cancer* **3**, 447–454 (2012).
22. Azam, M., Seeliger, M. A., Gray, N. S., Kuriyan, J. & Daley, G. Q. Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **15**, 1109–1118 (2008).
23. Hansch, C., Sammes, P. G. (Peter G. & Taylor, J. B. (John B. *Comprehensive medicinal chemistry : the rational design, mechanistic study & therapeutic application of chemical compounds.* (Pergamon Press, 1990).
24. Iqbal, N. & Iqbal, N. Imatinib: A Breakthrough of Targeted Therapy in Cancer. *Chemother. Res. Pract.* **2014**, 1–9 (2014).
25. Kinases, P., Therapeutic, A. S. & Leukemia, C. M. Imatinib mesylate - a new oral targeted therapy. **346**, 683–693 (2002).
26. Ricerca. Available at: https://www.codifa.it/cont/codica-ricerca/27/ricerca.asp?id_scheda=8040.

27. Capdeville, R., Buchdunger, E., Zimmermann, J. & Matter, A. Glivec (ST1571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nature Reviews Drug Discovery* **1**, 493–502 (2002).
28. Buchdunger, E., O'Reilly, T. & Wood, J. Pharmacology of imatinib (STI571). *Eur. J. Cancer* **38**, S28–S36 (2002).
29. Martins, J. An Introduction to Medicinal Chemistry, Fifth Edition- Graham L. Patrick.
30. Reddy, E. P. & Aggarwal, A. K. The ins and outs of bcr-abl inhibition. *Genes Cancer* **3**, 447–54 (2012).
31. Hochhaus, A. *et al.* Molecular and chromosomal mechanisms of resistance to imatinib (STI571) therapy. *Leukemia* **16**, 2190–6 (2002).
32. Weisberg, E. *et al.* Characterization of AMN107, a selective inhibitor of native and mutant Bcr-Abl. *Cancer Cell* **7**, 129–41 (2005).
33. Molica, M., Scalzulli, E., Colafigli, G., Foà, R. & Breccia, M. Insights into the optimal use of ponatinib in patients with chronic phase chronic myeloid leukaemia. *Ther. Adv. Hematol.* **10**, 204062071982644 (2019).
34. Zhou, T. *et al.* Crystal structure of the T315I mutant of AbI kinase. *Chem. Biol. Drug Des.* **70**, 171–81 (2007).
35. Huang, W.-S. *et al.* Discovery of 3-[2-(imidazo[1,2-b]pyridazin-3-yl)ethynyl]-4-methyl-N-{4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]-3-(trifluoromethyl)phenyl}benzamide (AP24534), a potent, orally active pan-inhibitor of breakpoint cluster region-abelson (BCR-ABL) kinase including the T315I gatekeeper mutant. *J. Med. Chem.* **53**, 4701–19 (2010).
36. Ricerca. Available at: <https://www.codifa.it/cont/codica-ricerca/27/ricerca.asp>.
37. Peyressatre, M., Prével, C., Pellerano, M. & Morris, M. C. Targeting cyclin-dependent kinases in human cancers: From small molecules to peptide inhibitors. *Cancers* **7**, 179–237 (2015).
38. Malumbres, M. Cyclin-dependent kinases. *Genome Biol.* **15**, 122 (2014).
39. Verma, R., McDonald, H., Yates, J. R. & Deshaies, R. J. Selective degradation of ubiquitinated Sic1 by purified 26S proteasome yields active S phase cyclin-Cdk. *Mol. Cell* **8**, 439–448 (2001).
40. Goldstein, M. & Kastan, M. B. The DNA Damage Response: Implications for Tumor Responses to Radiation and Chemotherapy. *Annu. Rev. Med.* **66**, 129–143 (2015).

41. Roskoski, R. Cyclin-dependent protein kinase inhibitors including palbociclib as anticancer drugs. *Pharmacol. Res.* **107**, 249–275 (2016).
42. Takaki, T. *et al.* The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 4171–4176 (2009).
43. Heitz, F. *et al.* Interactions of cyclins with cyclin-dependent kinases: a common interactive mechanism. *Biochemistry* **36**, 4995–5003 (1997).
44. Schang, L. M. Cyclin-dependent kinases as cellular targets for antiviral drugs. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **50**, 779–792 (2002).
45. Malumbres, M. & Barbacid, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. *Trends in Biochemical Sciences* **30**, 630–641 (2005).
46. Weinberg, R. A. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* **81**, 323–330 (1995).
47. Santarius, T., Shipley, J., Brewer, D., Stratton, M. R. & Cooper, C. S. A census of amplified and overexpressed human cancer genes. *Nature Reviews Cancer* **10**, 59–64 (2010).
48. Whitfield, M. L., George, L. K., Grant, G. D. & Perou, C. M. Common markers of proliferation. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 99–106 (2006).
49. Malumbres, M. & Barbacid, M. Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 153–66 (2009).
50. Sobhani *et al.* Updates on the CDK4/6 Inhibitory Strategy and Combinations in Breast Cancer. *Cells* **8**, 321 (2019).
51. Sánchez-Martínez, C., Gelbert, L. M., Lallena, M. J. & De Dios, A. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **25**, 3420–3435 (2015).
52. Losiewicz, M. D., Carlson, B. A., Kaur, G., Sausville, E. A. & Worland, P. J. Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **201**, 589–95 (1994).
53. Ibrance - capsula (Palbociclib), indicazioni, effetti collaterali, interazioni, terapia. Available at: <https://www.codifa.it/farmaci/i/ibrance-palbociclib-antineoplastici>.
54. Fry, D. W. *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Molecular Cancer Therapeutics* **3**, 1427–1437 (2004).

55. Fry, D. W. *et al.* Specific inhibition of cyclin-dependent kinase 4/6 by PD 0332991 and associated antitumor activity in human tumor xenografts. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 1427–38 (2004).
56. Finn, R. S. *et al.* The cyclin-dependent kinase 4/6 inhibitor palbociclib in combination with letrozole versus letrozole alone as first-line treatment of oestrogen receptor-positive, HER2-negative, advanced breast cancer (PALOMA-1/TRIO-18): a randomised phase 2 study. *Lancet. Oncol.* **16**, 25–35 (2015).
57. Boschelli, D. H. *et al.* Synthesis and tyrosine kinase inhibitory activity of a series of 2- amino-8H-pyrido[2,3-d]pyrimidines: Identification of potent, selective platelet-derived growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors. *J. Med. Chem.* **41**, 4365–4377 (1998).
58. Trumpp-Kallmeyer, S., Rubin, J. R., Humblet, C., Hamby, J. M. & Showalter, H. D. H. Development of a binding model to protein tyrosine kinases for substituted pyrido [2,3-d]pyrimidine inhibitors. *J. Med. Chem.* **41**, 1752–1763 (1998).
59. Barvian, M. *et al.* Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-one inhibitors of cyclin-dependent kinases. *J. Med. Chem.* **43**, 4606–4616 (2000).
60. Toogood, P. L. *et al.* Discovery of a potent and selective inhibitor of cyclin-dependent kinase 4/6. *J. Med. Chem.* **48**, 2388–406 (2005).
61. VanderWel, S. N. *et al.* Pyrido[2,3-d]pyrimidin-7-ones as specific inhibitors of cyclin-dependent kinase 4. *J. Med. Chem.* **48**, 2371–87 (2005).
62. Yin, L. *et al.* A highly potent CDK4/6 inhibitor was rationally designed to overcome blood brain barrier in glioblastoma therapy. *Eur. J. Med. Chem.* **144**, 1–28 (2018).
63. Chen, P. *et al.* Spectrum and Degree of CDK Drug Interactions Predicts Clinical Performance. *Mol. Cancer Ther.* **15**, 2273–2281 (2016).
64. Magalhaes, L. G., Ferreira, L. L. G. & Andricopulo, A. D. Recent Advances and Perspectives in Cancer Drug Design. *An. Acad. Bras. Cienc.* **90**, 1233–1250 (2018).