

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN

CHIMICA E TECNOLOGIA FARMACEUTICHE

TESI DI LAUREA

SINTESI DI INIBITORI DUALI DI CHINASI E ISTONE DEACETILASI

RELATORE: CH.MO PROF. GIOVANNI MARZARO

CORRELATORE: DOTT. CHRISTIAN VACCARIN

LAUREANDO: MARCO FRANCESCHINI

ANNO ACCADEMICO 2018-2019

*Alla mia Famiglia,
che mi è sempre stata accanto*

INDICE

1. RIASSUNTO	Pag. 1
2. INTRODUZIONE	Pag. 3
2.1 Molecole multi-target	Pag. 4
2.2 Proteinchinasi	Pag. 7
2.2.1 Tirosinchinasi	Pag. 7
2.2.2 TK recettoriali	Pag. 9
2.2.3 RTK di classe III	Pag. 10
2.2.4 RTK di classe XIV	Pag. 14
2.2.5 Inibitori di TK (TKI)	Pag. 16
2.3 Istone deacetilasi (HDAC) e inibitori (HDACI)	Pag. 20
3. OBIETTIVO	Pag. 25
4. RISULTATI E DISCUSSIONE	Pag. 27
4.1 VIA SINTETICA PROGRESSIVA	Pag. 27
4.1.1 SINTESI DI ETILE BROMOCINNAMOATO	Pag. 27
4.1.2 SINTESI DI ETILE BOROPINACOLCINNAMOATO	Pag. 28
4.1.3 SINTESI DI ETILE (E)-[6''-(4'''-AMMINOFENIL)-PIRIMID-4''-ILAMMINO]FENILPROP-2-ENOATO	Pag. 29
4.1.4 ULTERIORI OSSERVAZIONI	Pag. 30
4.2 VIA SINTETICA CONVERGENTE	Pag. 31
4.2.1 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-[6''-[4'''-(2 ^{IV} -FLUOROFENILUREIDO)FENIL] PIRIMID-4''-ILAMMINO}PROP-2-ENAMMIDE	Pag. 31
5. PARTE SPERIMENTALE	Pag. 33
5.1 MATERIALI	Pag. 33
5.2 STRUMENTAZIONI	Pag. 34
5.3 METODI	Pag. 35
5.3.1 SINTESI DI ETILE BROMOCINNAMOATO	Pag. 35
5.3.2 SINTESI DELLA PORZIONE 4-ANILINOPIRIMIDINICA COMUNE	Pag. 37

5.3.3 SINTESI DEI COMPOSTI POSSEDENTI ISOMERIA META _____	Pag. 38
5.3.3.1 SINTESI DI ETILE (E)-3'-[6''-[4'''-AMMINOFENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO] FENILPROP-2-ENOATO _____	Pag. 38
5.3.3.2 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-[6''-[4'''-(FENILUREIDIO)FENIL]PIRIMID-4''-ILAMMINO}PROP-2-ENAMMIDE _____	Pag. 40
5.3.3.3 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-[6''-[4'''-(2 ^{IV} -FLUORO-5 ^{IV} (TRIFLUOROMETIL) - FENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE _____	Pag. 44
5.3.3.4 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-[6''-[4'''-(2 ^{IV} -FLUOROFENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE _____	Pag. 48
5.3.4 SINTESI DEI COMPOSTI POSSEDENTI ISOMERIA PARA _____	Pag. 52
5.3.4.1 METODO PROGRESSIVO _____	Pag. 52
5.3.4.1.1 SINTESI DI ETILE (E)-4'-[6''-[4'''-AMMINOFENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO]FENILPROP-2-ENOATO _____	Pag. 52
5.3.4.1.2 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-[6''-[4'''-(FENILUREIDIO)FENIL]PIRIMID-4''-ILAMMINO}PROP-2-ENAMMIDE _____	Pag. 54
5.3.4.1.3 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-[6''-[4'''-(2 ^{IV} -FLUORO-5 ^{IV} (TRIFLUOROMETIL)-FENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE _____	Pag. 58
5.3.4.1.4 TENTATIVO DI SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-[6''-[4'''-(2 ^{IV} -FLUORO FENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE _____	Pag. 62
5.3.4.2 METODO CONVERGENTE _____	Pag. 66
5.3.4.2.1 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-[6''-[4'''-(2 ^{IV} -FLUOROFENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE _____	Pag. 66
6. BIBLIOGRAFIA _____	Pag. 73

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1. Struttura generale dei composti sintetizzati _____	Pag. IV
Figura 2. Struttura di CUDC-101 _____	Pag. 4
Figura 3. Elementi principali della struttura del dominio catalitico della chinasi ____	Pag. 8
Figura 4. Meccanismo di attivazione di un RTK _____	Pag. 10
Figura 5. Domini principali di un RTK di classe III _____	Pag. 11
Figura 6. Struttura di un RTK di classe III _____	Pag. 12
Figura 7. Combinazioni di riconoscimento possibili tra PDGF e recettori _____	Pag. 13
Figura 8. Ligandi e co-recettori di RET _____	Pag. 15
Figura 9. SAR di un inibitore di chinasi _____	Pag. 16
Figura 10. Struttura di Vandetanib _____	Pag. 17
Figura 11. Struttura di Cabozantinib _____	Pag. 17
Figura 12. Struttura di Sorafenib _____	Pag. 18
Figura 13. Struttura di BLU-667 _____	Pag. 18
Figura 14. Composti selettivi per la classe III e classe XIV di RTK _____	Pag. 19
Figura 15. Equilibrio di acetilazione/deacetilazione nella trascrizione genica ____	Pag. 20
Figura 16. Meccanismo idrolitico di HDAC _____	Pag. 22
Figura 17. Sito catalitico di HDAC occupato dal substrato o da un inibitore _____	Pag. 22
Figura 18. Struttura di Panobinostat _____	Pag. 23
Figura 19. SAR degli inibitori di HDAC _____	Pag. 23
Figura 20. Struttura di Erlotinib, Vorinostat e CUDC-101 con evidenziate le porzioni farmacoforiche _____	Pag. 24
Figura 21. Struttura generale dei composti sintetizzati _____	Pag. 25
Figura 22. Struttura dei composti sintetizzati _____	Pag. 32

INDICE DEGLI SCHEMI

Schema 1. Via sintetica generale _____	Pag. 27
Schema 2. Sintesi di 1m _____	Pag. 28
Schema 3. Sintesi di 1p _____	Pag. 28
Schema 4. Sintesi dei composti 2m e 2p. _____	Pag. 29
Schema 5. Coupling di Suzuki _____	Pag. 29
Schema 6. Via sintetica convergente _____	Pag. 31

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1. Legenda dei prodotti finali sintetizzati _____ Pag. 32

ABBREVIAZIONI

ACN	Acetonitrile
Arg	Arginina
ARTN	Artemina
Asp	Acido Aspartico
ATP	Adenosine Tri-Phosphate
B ₂ Pin ₂	Bispirinacolato di diboron
CD117	Cluster of Differentiation 117
CE	Cicloesano
c-KIT	proto-oncogene c-Kit
CLD	Cadherin-Like Domain
CRD	Cystein-Rich Domain
CSC	Cancer Stem Cell
CSF1R	Colony Stimulating Factor 1 Receptor
CYP3A4	Citocromo P450 3A4
DME	1,2-dimetossietano
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformammide
DMSO	Dimetilsolfossido
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDC	3-(Etiliminometilenammino)- <i>N,N</i> -dimetilpropan-1-ammina
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EMA	European Medicines Agency
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ESI	Electronspray Ionization
EtOAc	Etile acetato
EtOH	Etanolo
FDA	Food and Drug Administration
FGFR	Fibroblast Growth Factor Receptor
FLT3	fms-like Tyrosine kinase 3
FMTc	Familial Medullary Carcinoma of the Thyroid
GDNF	Glial-Derived Neurotrophic Factor

GFR	GDNF Factor Receptor
GIST	Gastrointestinal Stromal Tumor
Gly	Glicina
HAT	Histone Acetyltransferase
HDAC	Histone Deacetylase
HDACI	Histone Deacetylase Inhibitor
His	Istidina
HOBT	1-idrossibenzotriazolo
HPLC	High Performance Liquid Cromatography
HRMS	High Resolution Mass Spectroscopy
Ig	Immunoglobulina
iPrOH	<i>iso</i> -propanolo
Lys	Lisina
MAOS	Microwave Assisted Organic Synthesis
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
MEN	Multiple Endocrine Neoplasia
MeOH	Metanolo
MW	Microonde
NAD	Nicotinammide Adenina Dinucleotide
NEt ₃	Trietilamina
NH ₂ OTHP	<i>O</i> -(Tetraidro-2H-piran-2-il)idrossilamina
NK	Natural Killer
NMP	<i>N</i> -metilpirrolidone
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NRTK	Non-Receptor Tيروسine Kinase
NRTN	Neurturina
NSCLC	Non-Small Cell Lung Cancer
Pd(dppf)Cl ₂	Palladio difenilfosfinoferrocenedicloruro
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PDGFR	Platelet-Derived Growth Factor Receptor
Phe	Fenilalanina
PI3K	Fosfoinositide 3-chinasi
PLC- γ	Fosfolipasi C- γ

PSPN	Persefrina
R.T.	Room Temperature (Temperatura ambiente)
Raf	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RAS	Rat Sarcoma
RET	Rearranged during Transfection
Rf	Fattore di ritenzione
RNA	Ribonucleic Acid
RP	Reverse Phase
RTK	Receptor Tyrosine Kinase
SAHA	Suberoylanilide Hydroxamic Acid
SCF	Stem Cell Factor
SCFR	Stem Cell Factor Receptor
STK	Serine-Threonine Kinase
TEA	Trietilammina
THF	Tetraidrofurano
TK	Tyrosine Kinase
TKI	Tyrosine Kinase Inhibitor
TLC	Thin Layer Cromatography
TMS	Tetrametilsilano
TOF	Time Of Flight
Tyr	Tirosina
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
d	Doppietto
dd	Doppietto di doppietti
ddd	Doppietto di doppietti di doppietti
dt	Doppietto di tripletti
m	Multipletto
q	Quartetto
s	Singoletto
s all	Singoletto allargato
t	Tripletto

td	Tripletto di doppietti
tt	Tripletto di tripletti

1. RIASSUNTO

Negli ultimi anni la Targeted Therapy sta acquistando sempre maggiore importanza nella lotta al cancro. Si tratta di un nuovo approccio terapeutico che sfrutta una singola molecola per colpire uno specifico processo biologico alterato all'interno della cellula tumorale.

Tra i farmaci più utilizzati in tale ambito si trovano gli inibitori di chinasi, ovvero piccole molecole organiche in grado di bloccare la funzione di numerosi enzimi coinvolti nel processo di trasduzione del segnale a livello intracellulare. Questi enzimi sono generalmente coinvolti nel processo di propagazione di segnali proliferativi ed antiapoptotici, ed è dunque frequente riscontrare una loro deregolazione o sovra-espressione in diversi fenotipi tumorali.

Il cancro si presenta, tuttavia, come una malattia multifattoriale e l'utilizzo di molecole altamente selettive rischia di aumentare i fenomeni di farmacoresistenza. Infatti, il tumore diventa in grado di proliferare indipendentemente dalla singola via di segnale inibita, e l'inibitore di chinasi utilizzato perde di conseguenza efficacia terapeutica.

Ricerche condotte di recente hanno dimostrato che l'associazione di inibitori di istone deacetilasi (HDAC) e inibitori di chinasi migliora la sopravvivenza del paziente, riducendo in modo significativo la crescita tumorale. La sintesi, infine, di molecole chimeriche dotate di entrambe queste attività, come ad esempio CUDC-101, ha raggiunto l'obiettivo di migliorare l'efficacia della terapia, il profilo degli effetti collaterali e i fenomeni di farmacoresistenza.

Considerate queste premesse, il seguente progetto si pone come obiettivo la sintesi di una libreria di composti chimerici in grado di inibire varie isoforme di HDAC e chinasi (RET, c-KIT, PDGFR). Sulla base dei sostituenti e delle configurazioni possedute dalle molecole progettate è stato dunque possibile sintetizzare composti che si prevede possiedano diverse attività biologica.

I composti sono stati progettati unendo le porzioni farmacoforiche possedute da Panobinostat (inibitore non selettivo di diverse isoforme di HDAC) e da un inibitore di chinasi (selettivo verso RET, c-Kit e PDGFR β) a base pirimidinica recentemente sintetizzato nel nostro laboratorio.

Conoscendo la relazione struttura-attività delle molecole di partenza è stato possibile identificare le posizioni esposte al solvente appartenenti ad esse. A livello delle suddette posizioni è avvenuto il processo di fusione delle due porzioni farmacoforiche appartenenti

alle molecole di riferimento, conservando in tal modo le strutture responsabili dell'attività biologica anche nei composti chimerici ottenuti.

Le molecole sintetizzate si distinguono per:

- isomeria di posizione dell'anello portante la struttura idrossammica, in tal modo sarà possibile determinare la configurazione più adatta al legame con le proteine target;
- differente sostituzione dell'anello arilureidico terminale, al fine di modulare la selettività del composto nei confronti di diverse chinasi.

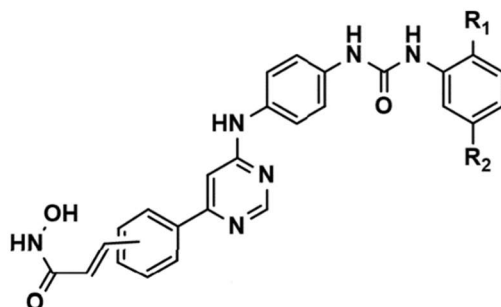


Figura 1. Struttura generale dei composti sintetizzati

2. INTRODUZIONE

Nel corso degli ultimi decenni, la ricerca di nuovi farmaci ad attività antitumorale si è interessata sempre più allo sviluppo di molecole selettive per un unico bersaglio terapeutico seguendo il paradigma “una molecola, un bersaglio, una malattia”¹ appartenente alla cosiddetta “Targeted Therapy”. I vantaggi di questo nuovo approccio terapeutico sono da ritrovarsi in un minor numero di effetti collaterali. Questo è dovuto ad una minor presenza di “off-targets” grazie all’elevata selettività del farmaco per il suo bersaglio principale².

Essendo il cancro una malattia multifattoriale, il blocco di un singolo processo alterato non porta quasi mai alla completa remissione della malattia. Questo rende necessaria la somministrazione simultanea di più farmaci nel tentativo di bloccare le numerose vie di segnale implicate nell’insorgenza e progressione della patologia tumorale. Questo nuovo approccio terapeutico viene definito “Multi-Target Therapy”³.

La comunità scientifica ha recentemente mostrato crescente interesse verso due target in particolare:

- Tirosinchinasi (TK);
- Istone Deacetilasi (HDAC).

I processi biologici mediati da queste due famiglie di enzimi, se deregolati, sono responsabili della crescita e sostentamento della cellula tumorale. La loro inibizione simultanea tramite somministrazione di più molecole single-target porta a migliori risultati clinici rispetto all’inibizione di un singolo bersaglio. Tale miglioramento è dovuto al blocco simultaneo di più processi biologici, diminuendo in tal modo l’insorgenza di farmaco-resistenza^{4, 5, 6}.

La simultanea somministrazione di più agenti terapeutici a diverso effetto biologico ad un singolo paziente viene comunemente definita “Cocktail Therapy”. Questo approccio terapeutico ha portato ad innumerevoli vantaggi nel trattamento delle neoplasie ma, nonostante ciò, la co-somministrazione di più agenti terapeutici si è dimostrata non priva di effetti indesiderati nel paziente, come ad esempio⁷:

- tossicità a carico dell’apparato gastrointestinale (nausea, vomito, diarrea);
- tossicità cutanea (rash, alopecia, ipersensibilità);
- tossicità cardiovascolare (ipertensione);
- tossicità del sistema immunitario (anemia, neutropenia, trombocitopenia).

Per trovare una soluzione a questo problema la ricerca in campo farmaceutico negli ultimi anni si sta focalizzando sullo sviluppo di composti chimerici in grado di bloccare simultaneamente più vie di segnale alterate all'interno della cellula tumorale. Questi composti vengono comunemente definiti "Multi-target Molecules".

2.1 Molecole multi-target

Una terapia multi-target può essere attuata mediante l'utilizzo di una singola molecola in grado di inibire più bersagli molecolari adempienti funzioni diverse all'interno dell'organismo.

Questo nuovo approccio terapeutico porta con sé numerosi vantaggi:

- una singola farmacocinetica che permette un dosaggio più accurato;
- assenza di possibili interazioni farmaco-farmaco;
- il regime terapeutico è semplificato ad una singola somministrazione, a vantaggio della compliance e diminuendo i rischi di errata o mancata assunzione per dimenticanza da parte del paziente;
- maggiore efficacia terapeutica e minori effetti collaterali⁶.

Quest'ultima osservazione deriva da recenti studi sperimentali che evidenziano un notevole aumento di efficacia nell'utilizzo terapeutico di composti multi-target rispetto alla chemioterapia classica. Nonostante ciò, i motivi alla base di quest'incremento di efficacia risultano tuttora poco chiari.

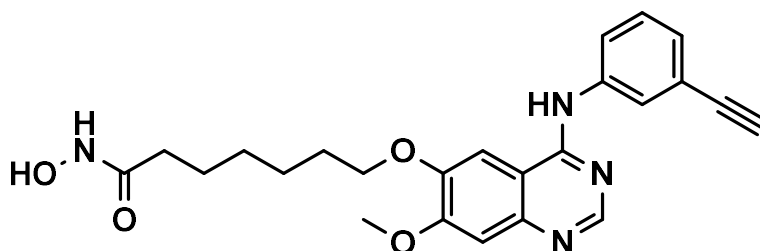


Figura 2. Struttura di CUDC-101

Una delle prime molecole multi-target sintetizzate è CUDC-101, composto che porta attività anti-EGFR (RTK) ed HDACI. Nato dall'unione delle porzioni farmacoforiche di Erlotinib e Vorinostat, CUDC-101 (Figura 2) sta dando buoni risultati in sperimentazione clinica, avendo superato di recente la fase I.

Uno dei maggiori punti di forza di CUDC-101 risulta essere il superamento della resistenza farmacologica solitamente indotta durante la terapia con inibitori di chinasi.

Resistenza farmacologica

I meccanismi di resistenza farmacologica sono classificabili in 4 macrocategorie:

- mutazione del target: è uno dei meccanismi tipici di resistenza agli inibitori di chinasi. Un esempio è ^{V804M}RET, dove la Valina è sostituita dalla Metionina. Questo rende la chinasi RET resistente a Vandetanib, in quanto la molecola non è in grado di legarsi al sito catalitico;
- sovraespressione del target: la cellula tumorale produce più target di quello che le sarebbe necessario per il proprio sostentamento in condizioni normali. Questo costringe ad aumentare la dose di farmaco per ottenere lo stesso effetto terapeutico, con il rischio che la dose richiesta sia superiore alla dose tossica, ma contemporaneamente lega fortemente la sopravvivenza della cellula a questa via di segnale;
- pompe d'efflusso: è un meccanismo di resistenza aspecifico. Le pompe di efflusso sono proteine transmembrana che si occupano di espellere le molecole esogene dalla cellula impedendo al farmaco di raggiungere il target ad una concentrazione efficace;
- presenza di cellule staminali tumorali (CSC)⁸: sono cellule tumorali che si replicano lentamente. Tali cellule, a seguito di un processo di differenziamento, sono spesso responsabili di una ricomparsa della malattia anche a seguito di un'apparente completa regressione della massa tumorale originaria.

Le CSC, a causa della loro lenta replicazione, sono intrinsecamente resistenti alla chemioterapia citostatica ed ai farmaci ad azione diretta sul DNA. Esse sono inoltre in grado di mantenere un comportamento simile a quello posseduto dalle cellule staminali somatiche, in quanto durante il processo di replicazione cellulare solo una delle due cellule generate andrà incontro a differenziamento, mentre la seconda cellula figlia manterrà il carattere staminale posseduto dalla cellula progenitrice.

Le CSC sviluppano inoltre meccanismi di difesa che permettono loro di vivere anche in presenza di fattori che normalmente ne impedirebbero la sopravvivenza. Esse infatti

sovraesprimono pompe d'efflusso, proteine per la riparazione di danni al DNA e amplificano vie di segnale antiapoptotiche.

Recenti studi hanno dimostrato che le CSC risultano sensibili a regolatori epigenetici come ad esempio gli inibitori di HDAC (HDACI), e la co-somministrazione di HDACI ed inibitori di tirosinchinasi (TKI) ha dimostrato di possedere una maggiore efficacia terapeutica grazie all'effetto sinergico posseduto dalla co-somministrazione dei due farmaci⁹.

2.2 Proteinchinasi^{9, 10, 11}

Le proteinchinasi sono enzimi coinvolti nella regolazione di numerosi processi biochimici fondamentali per un corretto sviluppo cellulare, come ad esempio:

- ciclo cellulare, regolando il passaggio tra le varie fasi e permettendo la divisione cellulare;
- metabolismo, intervenendo nella mobilitazione delle risorse energetiche cellulari;
- apoptosi, dando inizio alla cascata delle caspasi che termina con la morte cellulare programmata;
- trascrizione genica, attivando fattori di trascrizione permettendo la sintesi di mRNA e quindi regolando l'espressione di proteine.

Il chinoma umano è costituito da 518 chinasi raggruppate in famiglie, sottofamiglie e classi a seconda della loro similarità strutturale e funzionale. Data la presenza pressoché ubiquitaria delle chinasi e l'importanza delle loro funzioni, appare evidente come esse possano svolgere un ruolo fondamentale nello sviluppo di numerose neoplasie, e di conseguenza la loro importanza come target terapeutici.

Le chinasi sono enzimi appartenenti alla famiglia delle transferasi. Esse catalizzano il trasferimento del gruppo fosfato "γ" (terminale) da una molecola di ATP ad uno specifico residuo amminoacidico (Tirosina, Serina o Treonina) presente sulla proteina target, modificandone la struttura e dunque l'attività.

A seconda della specificità di substrato, le chinasi possono essere distinte in due sottogruppi:

- Serin-Treoninchinasi (STK), con specificità per gli ossidrili di Serina e Treonina;
- Tirosinchinasi (TK), specifiche invece per la funzione fenolica tipica della Tirosina.

2.2.1 Tirosinchinasi

Le TK vengono ulteriormente distinte in due categorie in funzione della loro collocazione cellulare:

- TK recettoriali (RTK): proteine transmembrana la cui funzione è quella di mediare un processo di trasduzione del segnale dal versante extracellulare a quello intracellulare;

- TK non recettoriali (NRTK): proteine citoplasmatiche la cui funzione è quella di fosforilare altre proteine durante la propagazione del segnale.

A seguito del binding di un ligando extracellulare ad un RTK avviene un cambiamento conformazionale dello stesso, con conseguente attivazione del dominio chinasi intracellulare. Questo consente la fosforilazione della proteina target, la quale è solitamente una NRTK. La trasduzione del segnale ha quindi inizio e viene amplificata dalla cosiddetta “cascata delle chinasi” nella quale avviene un’attivazione sequenziale di una o più NRTK. Il processo giunge a compimento quando viene fosforilato un fattore di trascrizione, il quale è quindi in grado di traslocare all’interno del nucleo e di svolgere la propria funzione di modulatore della trascrizione genica.

Strutturalmente le TK presentano un dominio catalitico altamente conservato tra le varie famiglie. Esso è costituito da 12 sottodomini organizzati in due lobi, tra i quali è collocato il sito catalitico dell’enzima, ovvero la tasca di legame affine al substrato da fosforilare ed il sito di legame dell’ATP utilizzato come cofattore. Il lobo *N*-terminale consiste in 5 β -foglietti ed 1 α -elica, mentre il lobo *C*-terminale è costituito da sole α -eliche. I due lobi sono collegati da una sequenza amminoacidica strutturalmente non organizzata, nota come “Hinge region”, letteralmente tradotta come “regione cerniera” che funge da giunto tra le due porzioni (*Figura 3*).

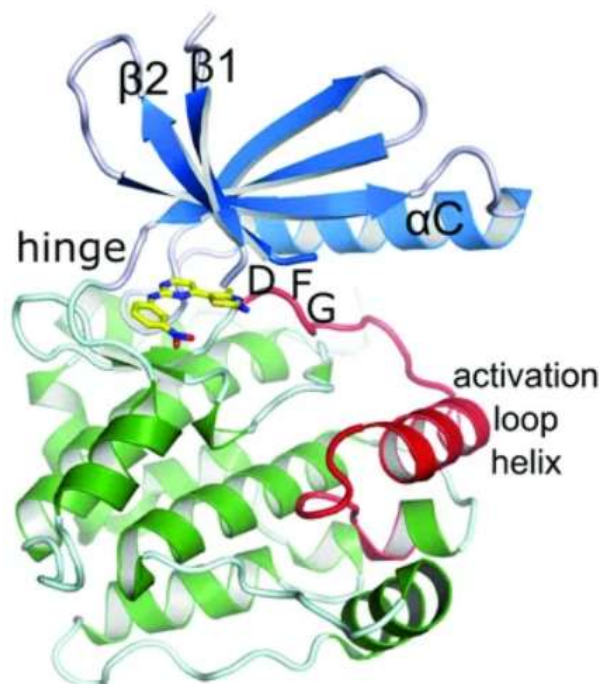


Figura 3. Elementi principali della struttura del dominio catalitico della chinasi

La tasca catalitica è divisa in due tasche più piccole, una anteriore ed una posteriore. La tasca anteriore presenta il sito di legame con l'ATP, mentre quella posteriore possiede funzione regolatoria verso l'attività enzimatica e comprende il "DFG motif".

Il "DFG-motif" consiste in un loop tripeptidico contenente i residui amminoacidici Asp-Phe-Gly. Esso fa parte del cosiddetto "activation loop" ed è noto anche come "Mg²⁺ positioning loop".

"DFG-in" è la conformazione attiva assunta dall'enzima quando il loop DFG è all'interno della tasca posteriore. La conformazione "DFG-out", viceversa, è la conformazione inattiva dell'enzima in quanto in tale posizione il DFG loop impedisce stericamente il legame dell'ATP.

La conformazione DFG-in inoltre accomoda all'interno della tasca anteriore un Asp il quale prende parte alla formazione del sito di legame per l'ATP. Esso ha la funzione di chelare il Mg²⁺ presente in ogni molecola di ATP, permettendo in tal modo il corretto posizionamento del fosfato terminale all'interno della Hinge Region.

Alla Hinge Region appartiene inoltre un residuo detto "gatekeeper", il quale limita l'accesso alla tasca posteriore. Esso è di notevole importanza in quanto può essere sfruttato per aumentare la selettività di alcuni farmaci (inibitori competitivi dell'ATP) per una data chinasi, in quanto questi vanno a riconoscere alcune regioni non essenziali per l'attività catalitica dell'enzima, come ad esempio la tasca posteriore lipofila esposta nella conformazione inattiva della proteina.

2.2.2 TK recettoriali¹²

Le TK recettoriali sono proteine transmembrana sensibili alla presenza extracellulare di fattori di crescita. In esse sono distinguibili 3 macro-domini comuni, individuati a seconda della loro collocazione rispetto alla membrana cellulare:

- dominio extracellulare: è la parte N-terminale della RTK che si occupa di riconoscere il ligando di pertinenza, spesso costituito da un fattore di crescita;
- dominio transmembrana: costituito da una regione proteica altamente idrofobica inserita all'interno della membrana cellulare;
- dominio intracellulare: costituente la porzione catalitica della chinasi e deputata al legame con il substrato da fosforilare.

Solitamente, in mancanza del ligando, le RTK sono presenti in forma monomericamente sulla membrana cellulare. Il binding del ligando al recettore avvia un processo di dimerizzazione recettoriale (*Figura 4*), mediato dalla formazione di ponti disolfuro intermolecolari tra i due monomeri. Nel dimero così formato avviene un processo di fosforilazione crociata (cross-fosforilazione) a carico di alcuni specifici residui di tirosina presenti nella coda C-terminale del recettore. Tale processo risulta necessario per l'attivazione del recettore stesso, il quale diviene così in grado di fosforilare ed attivare le successive NRTK, dando inizio in tal modo al processo di trasmissione del segnale verso il nucleo. Una iperattivazione di queste vie di segnale può portare ad una proliferazione incontrollata della cellula, la quale di conseguenza potrà andare incontro a fenomeni di cancerogenesi.

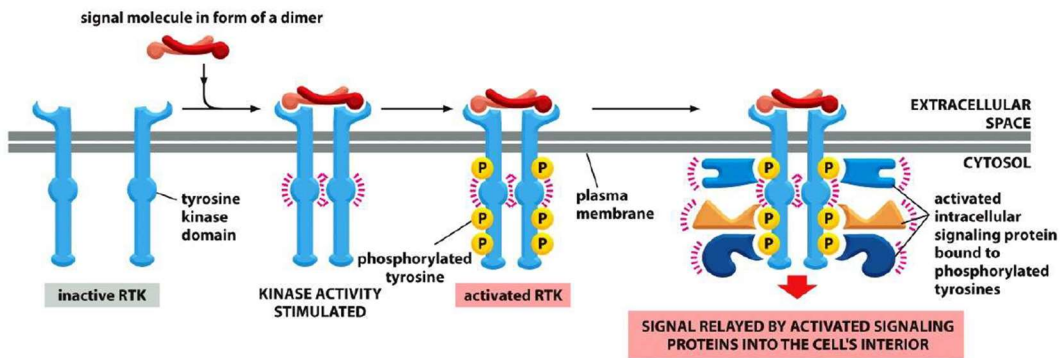


Figura 4. Meccanismo di attivazione di un RTK

2.2.3 RTK di classe III

La classe III delle RTK comprende c-KIT (detta anche CD117 o recettore per il fattore di crescita delle cellule staminali, SCFR), PDGFR α e β (recettori per il fattore di crescita derivato dalle piastrine), CSF1R (recettore per il fattore stimolante le colonie 1 o stimolante i macrofagi) ed FLT3 (tirosinchinasi 3 simil-fms).

Ogni RTK di classe III lega fattori di crescita dimerici e condivide con le altre RTK della stessa classe la medesima struttura di base. La loro identità proteica complessiva è del 20-40%, ma essa aumenta se si va ad esaminare l'identità dei domini chinasi, che può raggiungere il 63-85%¹³.

Il dominio extracellulare è composto da 5 Ig-like domain ricchi di cisteine che formano ponti disolfuro intramolecolari. La funzione di questi domini è diversa: i domini 2 e 3 (N-terminali) si occupano del riconoscimento del ligando, i domini 4 e 5 (C-terminali) invece si occupano dell'omodimerizzazione del recettore dopo aver riconosciuto l'opportuno fattore di crescita¹⁴ (Figura 5).

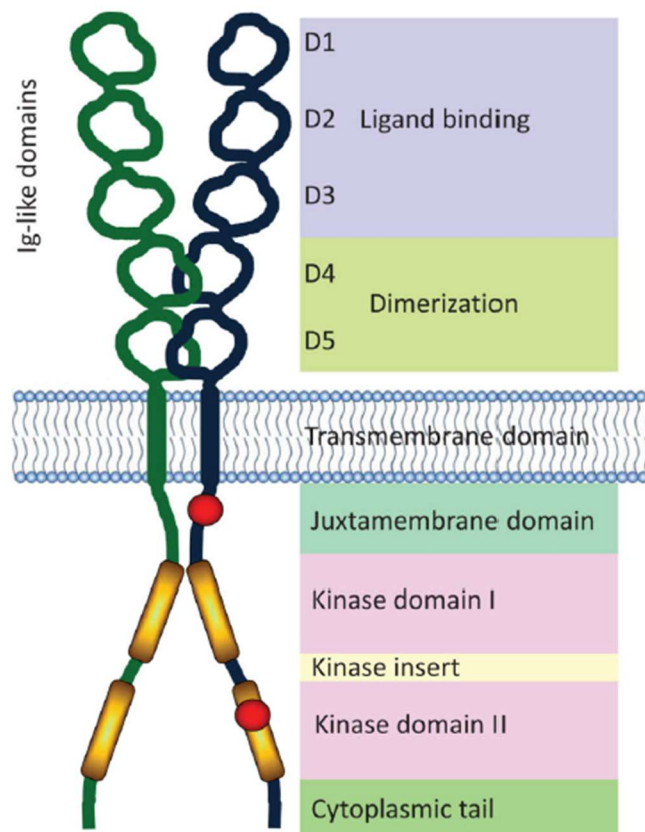


Figura 5. Domini principali di un RTK di classe

Il dominio intracellulare invece è composto dal dominio regolatorio adiacente alla membrana e dal dominio chinasi vero e proprio, rappresentante il sito catalitico della proteina. Il dominio regolatorio consiste in una sequenza amminoacidica utilizzata dall'enzima stesso per stabilizzare la conformazione inattiva della proteina mediante il suo inserimento all'interno del sito catalitico (Figura 6), il quale possiede la forma bilobata caratteristica delle proteinchinasi¹⁵.

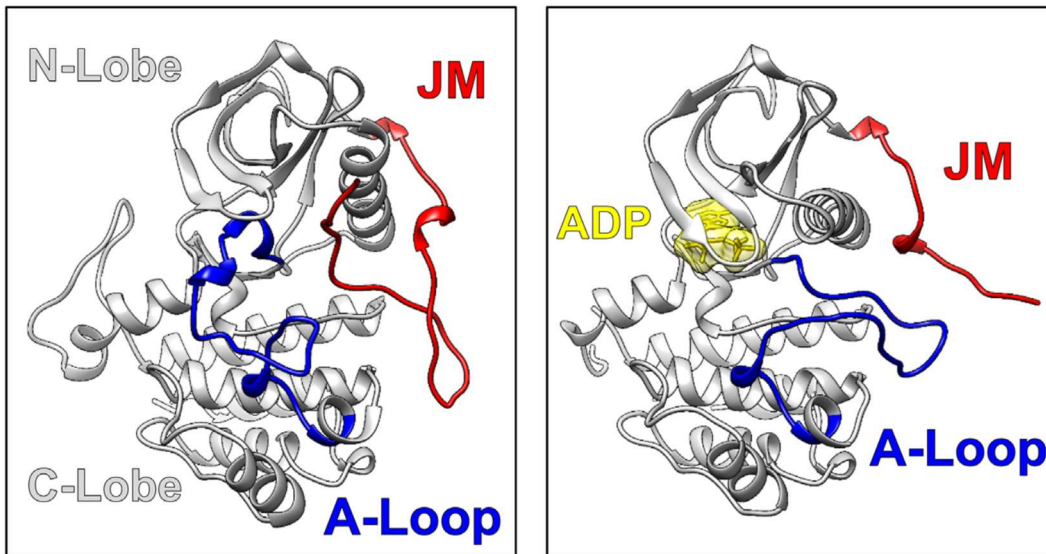


Figura 6. Rappresentazione della chinasi c-KIT come esempio di RTK di classe III. In rosso è visibile il dominio regolatorio, composto da 40 amminoacidi

c-KIT

Il proto-oncogene KIT è localizzato nel cromosoma 4q11–12. Esso codifica per la RTK c-KIT, e svolge importanti funzioni quali sopravvivenza, crescita e sviluppo cellulare di cellule ematopoietiche progenitrici, mastociti, cellule dell’epitelio del dotto mammario, cellule interstiziali di Cajal, differenziazione dei melanociti, funzioni cellulari ipocampali e funzionamento normale delle cellule germinali testicolari^{16, 17}.

Il ligando riconosciuto da c-KIT è la forma dimerica di SCF (fattore delle cellule staminali), il quale comporta la dimerizzazione e l’attivazione della RTK. Le vie di segnale attivate da c-KIT sono molteplici:

- RAS/ERK (proliferazione cellulare);
- PI3K (evasione dell’apoptosi e sopravvivenza cellulare);
- PLC- γ (proliferazione e sopravvivenza cellulare).

La definizione di proto-oncogene riferita a KIT è dovuta proprio a queste vie di segnale, in quanto una loro iperattivazione porta all’acquisizione da parte della cellula del fenotipo tumorale.

Le patologie causate da una mutazione “gain of function” (ovvero mutazioni che fanno aumentare l’attività di c-KIT) sono molteplici: tumore stromale gastrointestinale (GIST), mastocitoma, leucemia mastocitaria, leucemia mieloide acuta, seminoma, disgerminoma

e linfoma delle cellule T/natural killer (NK). Le mutazioni sono localizzate nella maggior parte dei casi negli esoni 8, 9, 11 e 17. Mutazioni a diversi codoni sono correlate non solo ad una diversa patologia, ma anche a differente aggressività della patologia stessa¹⁸.

PDGFR α e β

La famiglia dei fattori di crescita derivati dalle piastrine (PDGF) è composta da 5 membri: 4 omodimeri (PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-CC e PDGF-DD) ed un eterodimero (PDGF-AB). Nelle prime fasi di vita questi fattori di crescita contribuiscono allo sviluppo embrionale, mentre negli adulti sono coinvolti nella rigenerazione del tessuto lesionato in seguito a ferite. La famiglia recettoriale atta al loro riconoscimento è PDGFR, la quale è formata da tre dimeri recettoriali, costituiti rispettivamente da due omodimeri (PDGFR $\alpha\alpha$ e PDGFR $\beta\beta$) ed un eterodimero (PDGFR $\alpha\beta$). In funzione del fattore di crescita riconosciuto, PDGFR può omodimerizzare o eterodimerizzare. PDGF-BB è l'unico fattore di crescita riconosciuto da tutte e tre le isoforme recettoriali, mentre PDGF-DD viene riconosciuto solamente da PDGFR $\beta\beta$ (Figura 7).

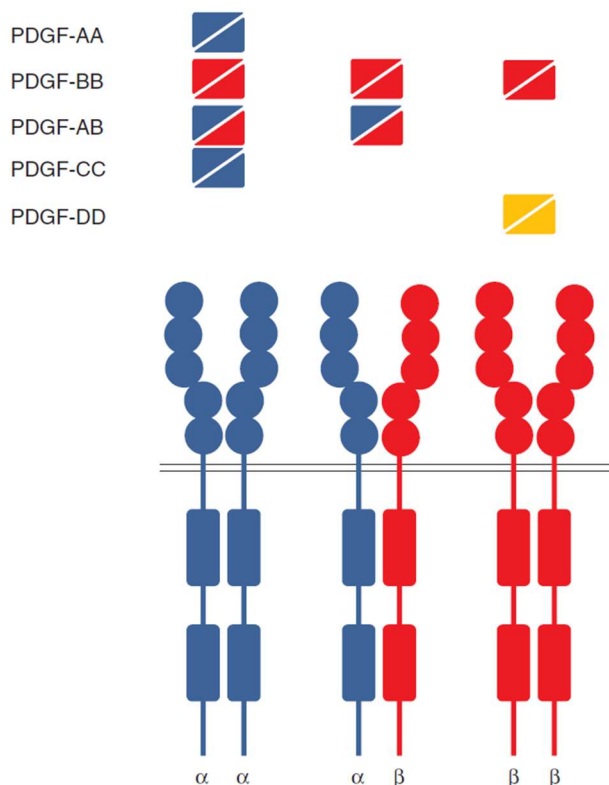


Figura 7. Combinazioni di riconoscimento possibili tra i vari PDGF e i loro recettori

I PDGF sono espressi da un elevato numero di cellule appartenenti a tessuti molto eterogenei tra loro, tra i quali possiamo trovare: fibroblasti, cellule di Leydig, cellule endoteliali, renali, neuroni, macrofagi e piastrine¹⁹. I recettori addetti al loro riconoscimento sono anch'essi espressi in numerose linee cellulari. Le tre isoforme recettoriali differiscono, oltre che per la loro composizione, per la tipologia di via di segnale attivata a livello intracellulare. Infatti, dimeri recettoriali diversi fosforilano target differenti²⁰. Le vie attivate favoriscono in ogni caso la proliferazione cellulare e l'evasione dal processo apoptotico.

Una iperattivazione di PDGFR viene spesso correlata allo sviluppo di numerose forme neoplastiche. Ad esempio, circa il 5% di GIST possiedono mutazioni puntiformi al gene PDGFR α ²¹, spesso in concomitanza a mutazioni a carico del gene KIT.

Nella leucemia mielomonocitica cronica, il gene PDGFR β è fuso a geni che codificano per proteine in grado di dimerizzare o oligomerizzare spontaneamente (ad esempio TEL)²², portando quindi ad un'attivazione costitutiva del RTK.

PDGFR α è inoltre implicato in numerose altre patologie: l'amplificazione del gene è stata rilevata in glioblastomi, carcinomi a cellule squamose dell'esofago, oligodendrogliomi anaplastici e sarcomi alle arterie polmonari²³. Una sovraespressione recettoriale può portare ad un'attivazione spontanea del recettore in modo indipendente dalla presenza o meno del ligando fisiologico, oltre a rendere la cellula estremamente sensibile ad esso²³. Inoltre, una mutazione causante un'attivazione massiva di PDGFR α è stata recentemente riscontrata come uno dei fattori scatenanti il glioblastoma umano²⁴.

PDGFR è espresso anche da varie cellule del sistema vascolare e dello stroma tumorale²⁵. La sua stimolazione favorisce l'angiogenesi tumorale e l'incremento della pressione interstiziale, caratteristiche presenti nella maggior parte dei tumori solidi, ostacolando in tal modo il trattamento del tumore in quanto viene compromesso il trasporto transcapillare²⁶.

Attualmente non esistono in commercio inibitori selettivi per PDGFR.

2.2.4 RTK di classe XIV²⁷

Il proto-oncogene RET (REarranged during Transfection) è localizzato sul cromosoma 10q11.2 ed è composto da 21 esoni. Esso codifica per un RTK attivo durante lo sviluppo di sistema nervoso enterico, morfogenesi renale e spermatogenesi²⁸.

RET è una RTK di classe XIV la cui struttura è costituita da:

- porzione extracellulare: formata da 4 CLD (Cadherin-like domains), e un CRD (Cystein-rich domain), quest'ultimo coinvolto nella dimerizzazione del recettore tramite la formazione di ponti disolfuro intermolecolari;
- porzione transmembrana: di 22 amminoacidi, in questo dominio sono presenti due serine che collaborano nella formazione del dimero dopo riconoscimento del fattore di crescita (il ligando del RTK) tramite legami ad idrogeno intermolecolari. È una porzione apolare, essendo inserita all'interno della membrana plasmatica;
- porzione intracellulare: contiene il dominio catalitico e la sequenza di amminoacidi C-terminale, la cui lunghezza contraddistingue diverse isoforme della proteina in esame.

I ligandi di RET sono fattori di crescita appartenenti alla famiglia GDNF (Glial-Derived Neurotrophic Factor): essi sono GDNF, NRTN (Neurturina), ARTN (Artemina) e PSPN (Persefrina), riconosciuti rispettivamente da GFR- α 1, GFR- α 2, GFR- α 3 e GFR- α 4, ovvero GDNF Factor Receptors (GFR), co-recettori (*Figura 8*) necessari per l'interazione del ligando a RET. La diversa espressione tissutale dei GFR permette il riconoscimento di diverse molecole della famiglia GDNF in diversi distretti dell'organismo, permettendo così un diverso sviluppo tissutale²⁹.

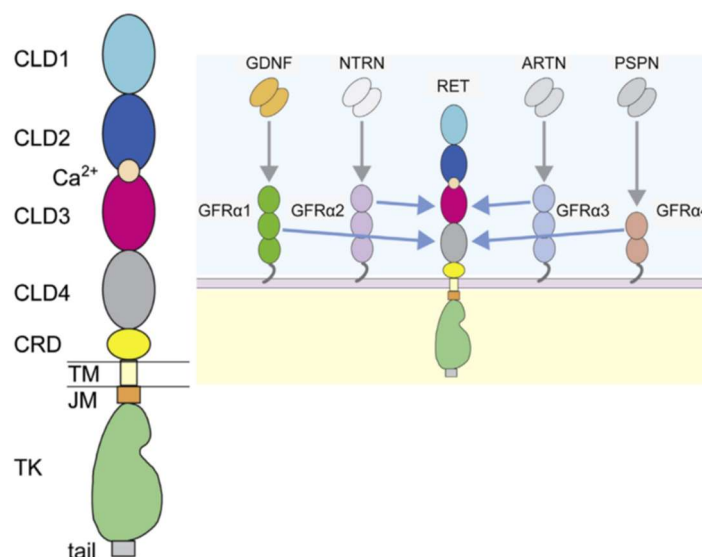


Figura 8. Ligandi e co-recettori di RET

Mutazioni a carico di RET sono responsabili dell'insorgenza di patologie neoplastiche di varia natura³⁰ in dipendenza del distretto in cui avviene tale mutazione. RET si presenta

come una proteina ampiamente distribuita all'interno dell'organismo, in quanto presente in svariati distretti, come ad esempio la midollare del surrene (cellule cromaffino-simili, feocromocitoma), i gangli enterici, il sistema nervoso e la tiroide. Le patologie più importanti causati da un'attività non fisiologica di RET sono MEN2 (neoplasia endocrina multipla di tipo 2) e FMTC (carcinoma alla midollare della tiroide di origine familiare). Recentemente sono state riscontrate mutazioni di RET anche in neoplasie al seno, al pancreas e polmone (NSCLC).

2.2.5 Inibitori di TK (TKI)

Le TK rappresentano circa un quarto delle chinasi totali e, data la loro importanza come regolatrici di numerosi processi biologici, rappresentano un interessante bersaglio terapeutico.

Gli inibitori competitivi (anche detti ATP-mimetici vista la loro competizione con l'ATP stesso) possiedono una struttura generale comune (*Figura 9*), che consiste in:

- un eterociclo aromatico (in verde) contenente generalmente un atomo di azoto necessario per l'interazione con la Hinge Region (mima la purina presente in ATP);
- una porzione lipofila (in rosso) che occupa la tasca idrofobica prossimale al sito catalitico dell'enzima⁹ e che garantisce selettività verso esso;
- una porzione (in blu) che collega le due parti sopra descritte.

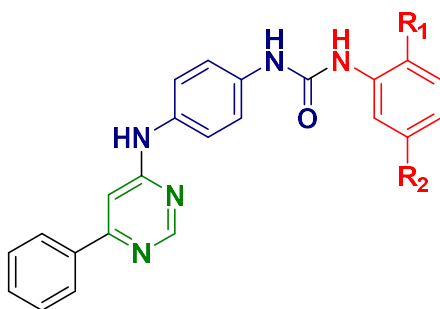


Figura 9. SAR di un inibitore di chinasi. In rosso la porzione che riconosce la tasca idrofobica posteriore del sito catalitico e che conferisce specificità alla molecola, in blu la regione lipofila che funge da linker, e in verde la porzione di molecola che riconosce la Hinge Region

I TKI a funzione ATP mimetica vengono comunemente distinti in 3 categorie a seconda della conformazione assunta dalla chinasi a cui si legano:

- inibitori di tipo I: legano la chinasi attiva in conformazione DFG-in;
- inibitori di tipo I ½: legano la chinasi inattiva in conformazione DFG-in;

- inibitori di tipo II: legano la chinasi inattiva in conformazione DFG-out. Sono mediamente più grandi e lipofili degli inibitori di tipo I in quanto la conformazione inattiva dell'enzima espone tasche idrofobiche più ampie.

TKI attualmente in commercio

Attualmente in commercio non ci sono TKI selettivi esclusivamente per PDGFR, c-KIT o RET. Esistono però farmaci, come Vandetanib e Cabozantinib (*Figura 10 e 11*), che possiedono attività verso queste chinasi. L'attività nei confronti di queste RTK è legata all'elevata conservazione del dominio catalitico in tutto il chinoma, e queste chinasi rappresentano quindi degli "off target" per i farmaci in esame.

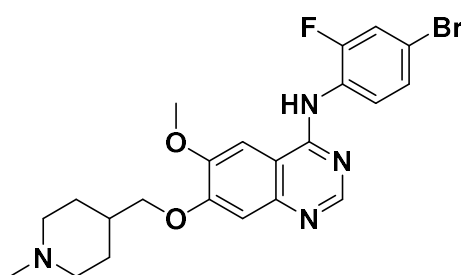


Figura 10. Struttura di Vandetanib

Vandetanib (*Figura 10*) è stato approvato nel 2011 dall'FDA per il trattamento del carcinoma midollare alla tiroide non asportabile chirurgicamente. Viene utilizzato anche in stato avanzato di progressione tumorale o in caso di tumore metastatico. Tra i target di questa molecola figurano RET, EGFR e VEGFR2. La terapia con Vandetanib va però spesso in contro a fenomeni di farmacoresistenza, come ad esempio nel caso della mutazione $V804M$ RET.

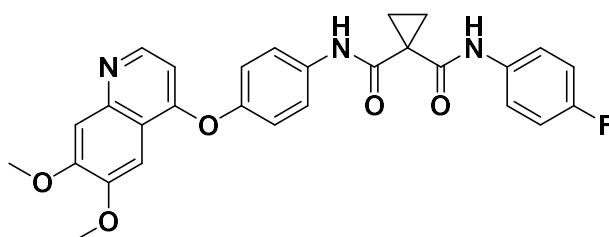


Figura 11. Struttura di Cabozantinib

Cabozantinib (*Figura 11*) è stato approvato dall'FDA nel 2012 per il trattamento del cancro midollare alla tiroide, ed è presente in commercio con il nome di Cometriq. Nel 2014 è stato approvato anche in Europa con le stesse indicazioni terapeutiche. Successivamente

l'EMA ha inoltre approvato l'utilizzo di Cabozantinib per il trattamento di seconda linea per il carcinoma a cellule renali e il carcinoma epatocellulare. Tra i target inibiti, oltre a RET, figurano anche MET e VEGFR2. Cabozantinib però è substrato di CYP3A4 e di vari trasportatori di membrana (tra cui la glicoproteina P). Questo varia notevolmente la biodisponibilità da individuo a individuo e può compromettere l'efficacia della terapia³¹. Inoltre, come Vandetanib, anche Cabozantinib non risulta attivo verso il mutante ^{V804M}RET.

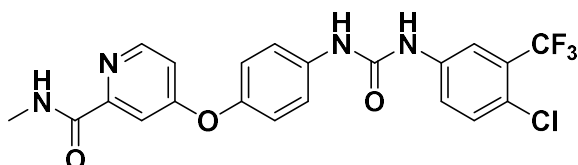


Figura 12. Struttura di Sorafenib

Sorafenib (Figura 12) è un altro inibitore di chinasi approvato dall'FDA nel 2005, e successivamente dall'EMA nel 2006, come trattamento di seconda linea per il carcinoma renale. Nel 2007 è stato successivamente approvato per il trattamento dell'epatocarcinoma, per cui rappresenta attualmente la terapia di prima linea. Infine, nel 2013, l'FDA ha approvato il suo utilizzo per il trattamento del carcinoma differenziato della tiroide (papillare o follicolare o a cellule di Hurtle), attualmente terapia di seconda linea in Europa.

L'ampio utilizzo di Sorafenib lo si deve alla sua capacità di inibire un elevato numero di chinasi, tra le quali figura anche Raf, la prima NRTK appartenente alla via di segnale MAPK. Esso è inoltre classificato come inibitore di RET, c-KIT, PDGFR β , VEGFR2 e FGFR. Questo rende Sorafenib un farmaco estremamente aspecifico. Alla luce di tali dati è chiaro come Sorafenib, all'epoca un grande traguardo per la comunità scientifica, risulti ora obsoleto.

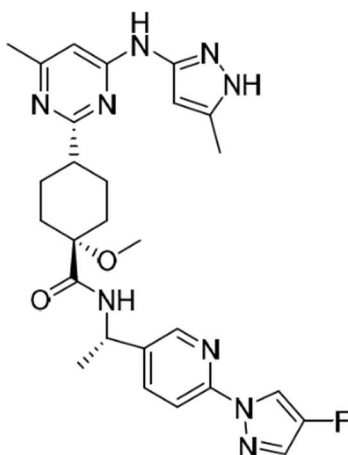


Figura 13. Struttura di BLU-667

La nuova generazione di inibitori di chinasi è stata concepita con l'obiettivo di inibire selettivamente un'unica chinasi mutata. Un esempio lo si può ritrovare in BLU-667 (*Figura 13*), composto attualmente in fase sperimentale il quale ha dimostrato una selettività 100 volte superiore per RET rispetto ad altre chinasi³². Tale approccio però non è esente dall'insorgenza di farmacoresistenza. Infatti, solo le cellule che esprimono RET saranno sensibili al farmaco, andando incontro a fenomeni di farmacoresistenza nel caso di un cambiamento delle vie di segnale utilizzate dalla cellula tumorale.

A partire dal 2015^{9,11}, nel laboratorio in cui questa tesi è stata svolta, sono stati individuati alcuni composti a struttura diarilureidica in grado di inibire selettivamente RTK di classe III e di classe XIV.

Gli Hit compound risultano possedere una struttura simile tra loro, e si distinguono solo per la differente sostituzione del fenile terminale. Questo rappresenta un'ulteriore conferma di come la tasca idrofobica posteriore al sito catalitico, riconosciuta dalla porzione lipofila terminale del TKI, sia determinante per la selettività TKI-RTK.

Il composto rivelatosi maggiormente attivo verso le RTK di classe III possiede un sostituente fenilico come anello terminale (*Figura 14-A*). Viceversa, la presenza di un fenile disostituito in posizione 2 e 5 consente l'inibizione aggiuntiva della classe XIV (*Figura 14-B*).

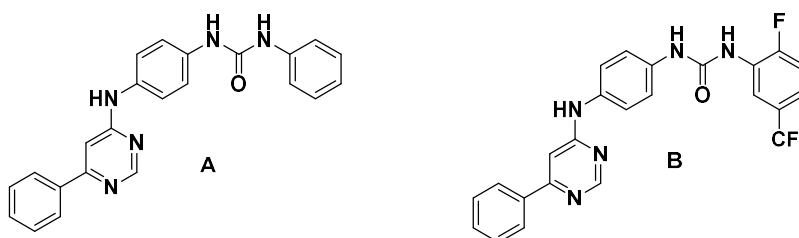


Figura 14. In Figura A è rappresentata la struttura del composto selettivo per la classe III dei RTK, in Figura B quella selettiva per la classe XIV

Il composto in *Figura 14-A*, durante uno screening effettuato verso un pannello di 50 chinasi, ha dimostrato di possedere un'elevata potenza ($IC_{50} < 0.1\mu M$) selettivamente verso c-KIT e PDGFR β .

Il composto in *Figura 14-B* è invece risultato attivo nei confronti della chinasi RET, dimostrando un'elevata potenza anche nei confronti del mutante V804M, proteina solitamente resistente al trattamento con la maggior parte degli inibitori di chinasi attualmente in commercio.

2.3 Istone deacetilasi (HDAC) e inibitori (HDACI)

Gli enzimi noti come Istone deacetilasi (HDAC) sono una classe variegata di idrolasi. La loro funzione principale è quella di idrolizzare il legame ammidico tra la catena laterale di una lisina istonica e un acetile.

Il DNA è contenuto nel nucleo cellulare sottoforma di una struttura compatta e altamente organizzata nota come cromatina, di cui il nucleosoma costituisce l'unità strutturale più semplice. Esso è formato da un ottamero di istoni, proteine basiche attorno al quale si avvolge la doppia elica di DNA. La basicità degli istoni è dovuta alla presenza di numerosi residui amminoacidici presentanti gruppi protonabili (Arg e Lys), omogeneamente distribuiti sulla superficie dell'istone, attorno al nucleo idrofobico centrale.

Questi residui basici sono i punti sui quali avvengono le principali modifiche post-traduzionali all'istone. La modifica post-traduzionale sicuramente più frequente risulta essere l'acetilazione, un processo reversibile (Figura 15), regolato da due enzimi³³:

- istone acetiltransferasi (HAT) coinvolta nel processo di acetilazione dell'istone;
- istone deacetilasi (HDAC) coinvolta nel processo di deacetilazione dell'istone.

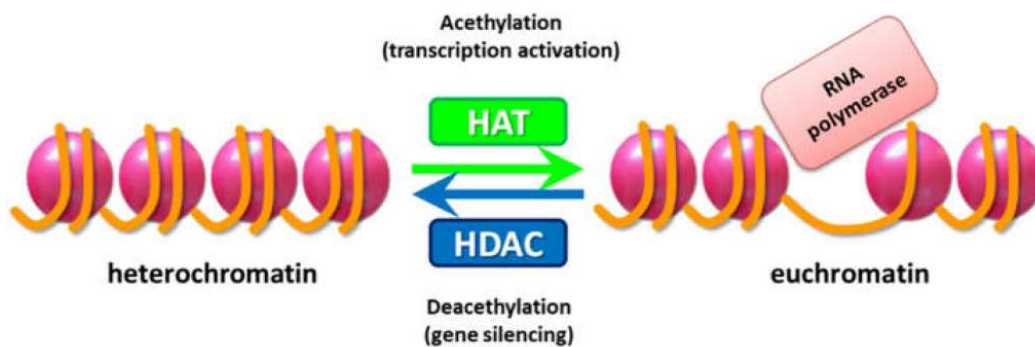


Figura 15. Equilibrio di acetilazione/deacetilazione nella trascrizione genica

Questo processo possiede lo scopo ultimo di regolare l'espressione genica. Uno stato di elevata acetilazione dell'istone normalmente corrisponde ad un alto grado di attivazione trascrizionale, viceversa la deacetilazione degli istoni ha l'effetto di silenziare l'espressione genica. Questo meccanismo è spiegabile sulla base del principio di formazione di coppie ioniche. Il DNA è una macromolecola carica negativamente a causa della presenza di gruppi fosfato acidi presenti in forma dissociata a pH fisiologico, mentre gli istoni essendo ricchi di lisine ed arginine, a pH fisiologico risultano essere protonati e dunque carichi positivamente.

Le lisine, se acetilate, non sono protonabili a pH fisiologico, in quanto risultano essere delle ammidi. Nel primo dei due casi, il DNA (polianionico) si avvolgerà all'istone in una struttura nota come eterocromatina, impedendo in tal modo trascrizione genica (che prevede l'apertura della doppia elica di DNA). Nel secondo caso, invece, l'acetilazione operata da HAT rimuove la carica positiva degli istoni. In tal modo viene quindi a mancare uno dei due partner necessari per la formazione di coppie ioniche stabili, e il DNA sarà dunque presente nel nucleo nella forma nota come eucromatina, permettendo la trascrizione genica.

Gli HDAC vengono distinti sulla base del loro meccanismo catalitico in³⁴:

- enzimi NAD⁺ dipendenti;
- metalloenzimi Zinco dipendenti.

Questa ultima classe è composta da 10 isoforme enzimatiche suddivise in due in funzione del loro distretto di competenza all'interno della cellula:

- classe I: sono enzimi endonucleari (HDAC 1, 2, 3, 8);
- classe II: sono enzimi esonucleari (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10).

Gli HDAC di Classe I e II hanno dimostrato di essere bersagli validi per la terapia antineoplastica in quanto una loro inibizione comporta una ridotta crescita tumorale in vivo.

L'elemento strutturale di HDAC di maggiore interesse è sicuramente il sito catalitico. Esso è situato al termine di un canale lungo circa 11Å all'interno dell'enzima, al termine del quale è collocato uno ione Zn²⁺ indispensabile per l'attività idrolitica. All'interno della tasca catalitica dell'enzima lo ione zinco è coordinato da un residuo di istidina, due aspartati ed una molecola d'acqua, quest'ultima di fondamentale importanza per l'idrolisi del legame ammidico operata da HDAC.

Durante il processo di idrolisi (*Figura 16*) lo Zn²⁺ e la Tyr³⁰⁶ polarizzano il carbonile ammidico dell'acetil-lisina coordinandone l'ossigeno acetilico, aumentandone l'elettrofilia e favorendo in tal modo il successivo attacco nucleofilo da parte dell'acqua, a sua volta resa più nucleofila grazie allo stesso Zn²⁺, His¹⁴² ed His¹⁴³.

L'intermedio tetraedrico così formato risulta essere particolarmente instabile e collassa velocemente alla forma di carbonile, eliminando in tal modo il residuo acetilico dalla

catena laterale della lisina appartenente alla proteina substrato. Il prodotto finale della catalisi è quindi una lisina carica positivamente ed uno ione acetato.

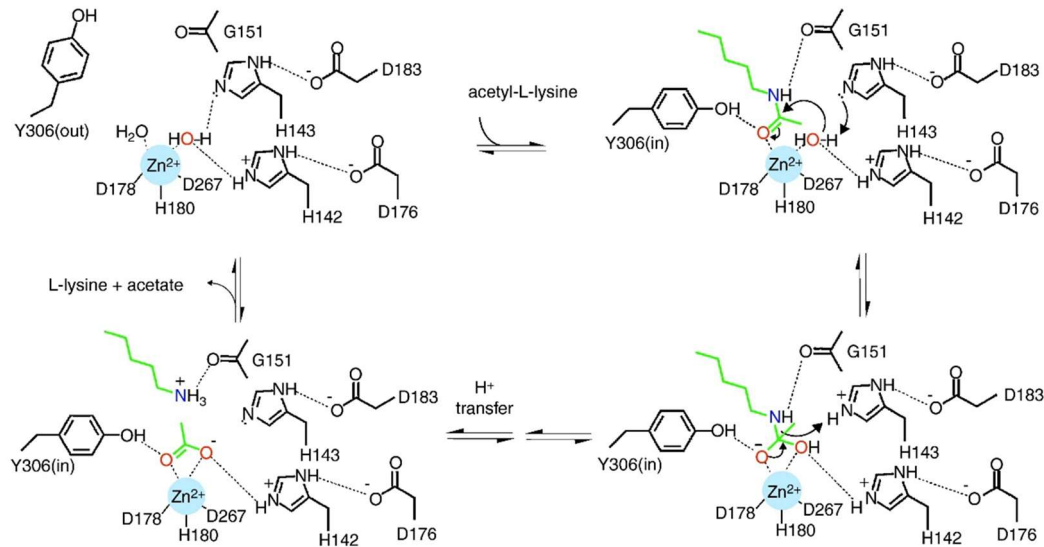


Figura 16. Meccanismo idrolitico di HDAC

Lo zinco si rivela quindi fondamentale anche per le strategie di inibizione dell'enzima stesso. Gli HDACI sono infatti chelanti che legano lo Zn^{2+} catalitico (Figura 17-A e 17-B) spiazzando la molecola d'acqua ad esso coordinata, la quale è indispensabile per lo svolgimento del processo di idrolisi. La presenza dell'HDACI costituisce inoltre un impedimento sterico per il legame del substrato al sito catalitico dell'enzima^{34,35}.

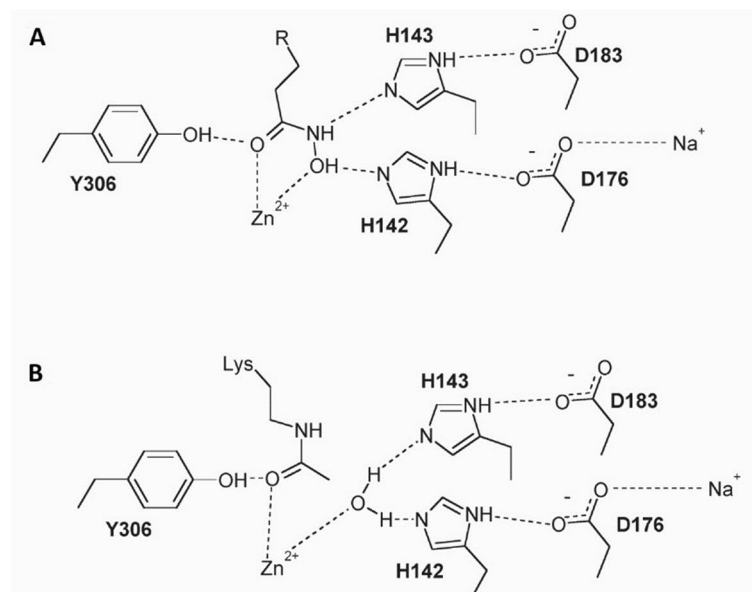


Figura 17. La Figura A rappresenta il sito catalitico occupato dall'inibitore (acido idrossammico), confrontato con la Figura B, che rappresenta il sito catalitico occupato dal substrato

L'inibizione di HDAC ha conseguenze importanti nello sviluppo della cellula tumorale. Una sovraespressione di tali enzimi ha infatti come effetto finale il silenziamento dei geni che ostacolano la crescita tumorale, quali i geni pro-apoptotici e regolatori del ciclo cellulare. L'inibizione di HDAC costringe la cellula ad esprimere questi geni, andando a ribilanciare la presenza di stimoli pro- e anti-apoptotici al suo interno. Il risultato finale è rappresentato dall'induzione della differenziazione cellulare, arresto della crescita tumorale ed apoptosi delle cellule trasformate, compromettendo in tal modo l'intera architettura tumorale.

SAHA (noto anche con il nome di Vorinostat) è stato il primo HDAC approvato dall'FDA ed attualmente viene impiegato in terapia per il trattamento del linfoma a cellule T. Chimicamente SAHA appartiene alla classe degli acidi idrossammici così come Panobinostat (*Figura 18*), HDACI di seconda generazione il cui utilizzo in terapia è stato recentemente approvato dall'EMA per il trattamento associato del mieloma multiplo.

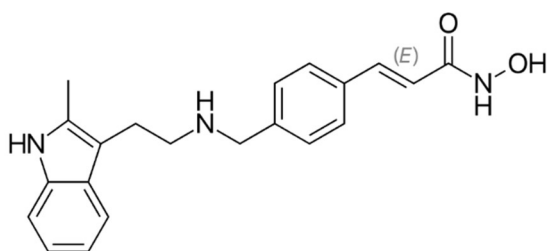


Figura 18. Struttura di Panobinostat

La relazione struttura-attività degli HDACI è rappresentata in *Figura 19* (in cui è rappresentata anche la struttura chimica di Vorinostat). La porzione farmacoforica comune a questa classe di molecole è rappresentata da una funzione chelante lo ione zinco, la quale riesce a raggiungere lo ione metallico situato in profondità all'interno dell'enzima grazie ad un linker idrofobico di lunghezza variabile. Legata al linker, dalla parte opposta rispetto alla funzione idrossammica, è presente una regione molecolare

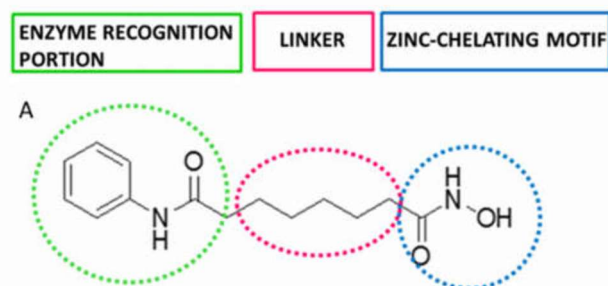


Figura 19. SAR degli inibitori di HDAC

lipofila la cui funzione è quella di impedire stericamente l'accesso del substrato al sito catalitico.

È stato dimostrato che l'associazione di HDACI con altri farmaci aumenta l'attività antitumorale di questi ultimi⁴. L'utilizzo di molecole che possiedono una porzione in grado di inibire HDAC ha dimostrato un'efficacia addirittura superiore⁶ rispetto alla co-somministrazione dei due farmaci separati. È noto che gli HDACI aumentano l'efficacia di alcune molecole (TKI in primis), ma non il perché i composti chimerici mostrino attività superiore rispetto all'associazione dei due farmaci separati. Questa evidenza sperimentale costituisce dunque una valida motivazione per sintetizzare e testare nuovi inibitori duali, così da approfondirne ulteriormente l'efficacia e il meccanismo d'azione.

Razionale e progettazione

CUDC-101 (*Figura 20-B*) è il primo inibitore duale di chinasi e HDAC. La sua struttura consiste nell'unione delle porzioni attive di Erlotinib (TKI, evidenziato in rosso, *Figura 20-A*) e Vorinostat (HDACI, evidenziato in blu, *Figura 20-C*). La progettazione di questa molecola si è basata sull'eliminazione delle porzioni esposte al solvente di entrambe le molecole progenitrici, per creare una singola molecola figlia in grado di mantenere l'attività su entrambi i target⁶.

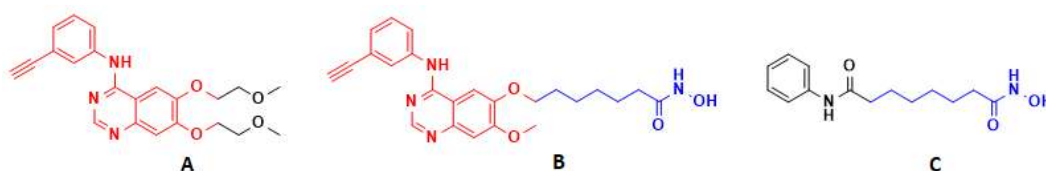


Figura 20. In rosso la porzione farmacoforica di Erlotinib (A) in blu quella di Vorinostat (C). CUDC-101 (B) evidenzia le porzioni farmacoforiche con gli stessi colori dal farmaco da cui derivano

Seguendo lo stesso principio, i derivati sintetizzati in questo progetto sono stati basati sugli hit compound selettivi per RTK di classe III e classe XIV (*Figura 14-A e 14-B*) e Panobinostat (*Figura 18*).

3. OBIETTIVO

L'obiettivo del progetto di tesi è la sintesi di una libreria di "inibitori duali" a struttura diarilureidica, portanti due funzioni farmacoforiche in grado di inibire bersagli differenti. Una di esse è la porzione inibitrice di chinasi, l'altra invece è in grado di inibire una o più isoforme di HDAC.

Le molecole sintetizzate saranno in futuro testate in vitro su:

- un pannello di chinasi di classe III e classe XIV, al fine di verificarne sia l'attività che il profilo di selettività nei confronti di target chinasi ad elevata omologia strutturale;
- su diverse linee cellulari tumorali, mediante l'utilizzo di anticorpi fluorescenti selettivi per l'istone H3 acetilato, al fine di verificare l'attività di queste molecole nei confronti di HDAC e per determinare, in modo indiretto, il grado di permeabilità cellulare posseduto da questi composti.

I diversi analoghi differiscono tra loro a livello del fenile diarilureidico terminale. Questa funzione lipofila accessoria, andando ad accomodarsi nella tasca idrofobica situata posteriormente al sito catalitico, determina la selettività del composto per una data chinasi. A livello teorico, l'utilizzo di gruppi fenilici variamente sostituiti, consente una modulazione dell'affinità di queste molecole verso un'ampia gamma di chinasi.

Gli analoghi sintetizzati in questo progetto si distinguono per:

- geometria presente a livello della funzione idrossilammidocinnamica, per ricercare la configurazione più adatta al legame con le proteine target;
- sostituenti presenti a livello della funzione arilureidica terminale (Fenilurea, 2-Fluorofenilurea, 2-Fluoro-5-(Trifluorometil)Fenilurea).

La struttura generale comune appartenente ai derivati progettati è rappresentata in *Figura 21*.

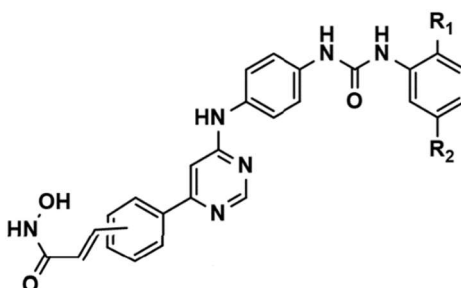


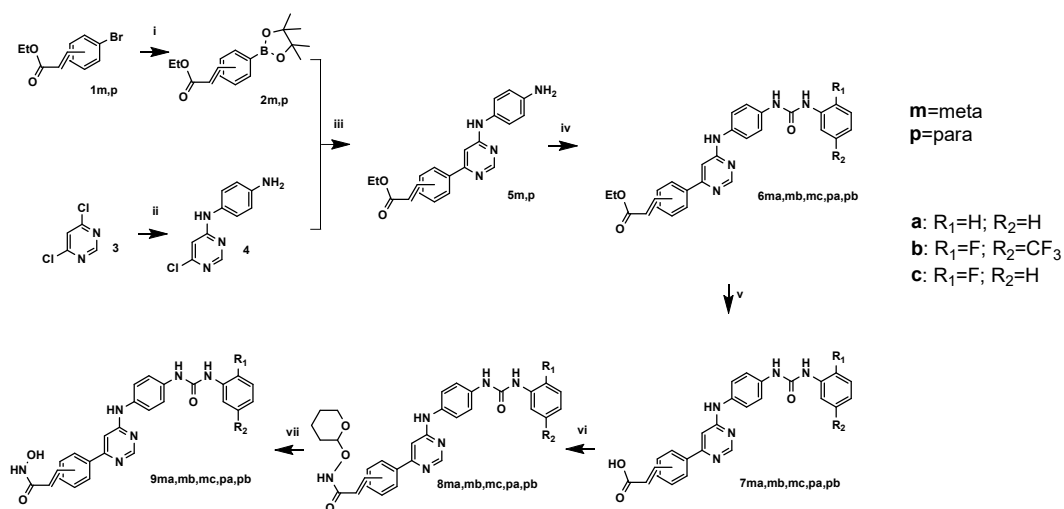
Figura 21. Struttura generale dei composti sintetizzati

Obiettivo _____

4. RISULTATI E DISCUSSIONE

4.1 VIA SINTETICA PROGRESSIVA

La via sintetica rappresentata nello *Schema 1* è stata utilizzata per la realizzazione di entrambe le classi di derivati *para* e *meta* sostituiti. I prodotti finali sintetizzati tramite questa via sintetica sono **9ma**, **9mb**, **9mc**, **9pa** e **9pb**.



Schema 1. Via sintetica generale. Condizioni di reazione:

i) B₂Pin₂, Pd(dppf)Cl₂, CH₃COOK, diossano, 80°C, 24 h, rese: 80% **2m** e 80% **2p**.

ii) *p*-fenilendiammina, NEt₃, *i*PrOH, MW, 90°C, 20 min, resa 80%.

iii) Pd(PPh₃)₄, K₂CO₃, DME, H₂O, MW, 130°C, 5 min, rese: 43% **5m** e 50% **5p**.

iv) arilissocianato, DMF, R.T., 6 h, rese: 80% **6ma**, 84% **6mb**, 72% **6mc**, 85% **6pa** e 82% **6pb**.

v) NaOH, THF, H₂O, 50°C, 16 h, rese: 87% **7ma**, resa quantitativa **7mb**, resa quantitativa **7mc**, 70% **7pa** e 87% **7pb**.

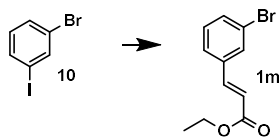
vi) NH₂OTHP, EDC, HOBT, NEt₃, DMSO, R.T., 16h, rese: 88% **8ma**, 74% **8mb**, 88% **8mc**, 70% **8pa** e 81% **8pb**.

vii) HCl, MeOH, R.T., 2h, rese: 74% **9ma**, 83% **9mb**, 77% **9mc**, resa quantitativa **9pa** e resa quantitativa **9pb**.

4.1.1 SINTESI DI ETILE BROMOCINNAMOATO

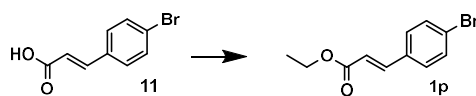
Le vie sintetiche utilizzate per la realizzazione dei derivati differiscono solamente per l'utilizzo di due diversi regioisomeri (*meta* e *para*) dell'etile bromocinnammoato di partenza.

Per la sintesi dei derivati *meta*-sostituiti, il 3-bromocinnammoato (**1m**) desiderato è stato realizzato mediante un coupling palladio catalizzato (reazione di Heck), utilizzando 3-bromoiodobenzene (**10**) ed etile acrilato come reagenti di partenza (*Schema 2*).



Schema 2. Sintesi di **1m**. Condizioni di reazione:
etile acrilato, TEA, Pd(OAc)₂, NMP, 80°C, 2h, resa 87%

Nel caso dei derivati *para*-sostituiti, è stato utilizzato come prodotto di partenza l'acido 4-bromocinnamico (**11**) la cui funzione carbossilica è stata sottoposta ad esterificazione con etanolo in ambiente acido per H₂SO₄ (Schema 3).



Schema 3. Sintesi di **1p**. Condizioni di reazione:
H₂SO₄, EtOH, riflusso, 16h, resa quantitativa

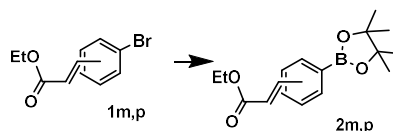
Le buone rese ottenute per entrambe queste reazioni hanno consentito la sintesi dei prodotti di partenza desiderati in elevate quantità.

4.1.2 SINTESI DI ETILE BOROPINACOLCINNAMMOATO

Per la successiva reazione di borilazione (Schema 4), la corretta scelta del solvente utilizzato ed il tempo di reazione si sono rivelati fattori fondamentali. La formazione del composto **2p** è stata inizialmente tentata utilizzando *N,N*-dimetilformammide come solvente alla temperatura di 70°C. Durante l'analisi quali-quantitativa del grezzo di reazione così ottenuto, questo si è dimostrato essere costituito da una miscela complessa di prodotti di degradazione. La formazione dei suddetti sottoprodotti si è dimostrata correlata all'instabilità del risultante estere boronico nelle condizioni di reazione utilizzate. Durante le varie reazioni di prova effettuate, infatti, è stata notata una relazione tra il tempo di reazione e la formazione di sottoprodotti: il riscaldamento della miscela per un tempo superiore alle due ore si è rivelato deleterio per l'ottenimento del prodotto desiderato.

Il composto **2m** si è, invece, rivelato essere molto più stabile. Tuttavia, l'ottenimento del prodotto desiderato ha previsto l'eliminazione dell'ossigeno dall'ambiente di reazione mediante tre cicli di vuoto e refill con azoto. Il prodotto di interesse è stato quindi ottenuto termostatando a 80°C per un tempo variabile (dalle 20 alle 24 ore), non

determinante per la resa di reazione. I vantaggi riscontrati nell'utilizzo di quest'ultima reazione si sono rivelati essere molteplici: *in primis*, una maggiore riproducibilità del metodo, in quanto viene scongiurata la formazione di sottoprodotti di degradazione al prolungarsi del tempo di reazione. Inoltre, si è riscontrato un miglioramento del processo di purificazione, avvenuto per cromatografia a fase diretta, grazie alla formazione di impurezze caratterizzate da un fattore di ritenzione molto diverso se paragonato a quello



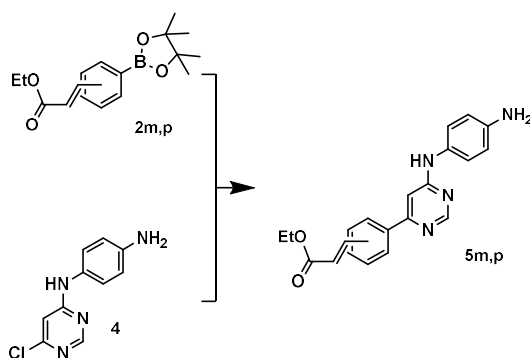
Schema 4. Sintesi dei composti **2m** e **2p**.

- **2p**: B_2pin_2 , $Pd(dppf)Cl_2$, CH_3COOK , DMF, 70° , 2h, resa 80%
- **2m**: B_2pin_2 , $Pd(dppf)Cl_2$, CH_3COOK , diossano, $80^\circ C$, 24 h, resa 80%

posseduto dalla molecola di interesse

4.1.3 SINTESI DI ETILE (E)-[6''-(4'''-AMMINOFENIL)-PIRIMID-4''-ILAMMINO]FENILPROP-2-ENOATO

L'ottimizzazione operata alla successiva via di sintesi comune ha consentito di ottenere un'elevata efficienza generale del processo, raggiungendo rese superiori al 60% in ogni step di reazione. Unica eccezione si è rivelata essere il coupling di Suzuki (*Schema 5*) per cui, nonostante svariati tentativi di ottimizzazione, non è stato possibile ottenere rese superiori al 50% circa. Un parziale miglioramento del processo è stato reso possibile dallo sfruttamento della tecnica di Sintesi Organica Assistita da Microonde (MAOS) mediante un riscaldamento a $130^\circ C$ mantenuto per 5 minuti.



Schema 5. Coupling di Suzuki. Condizioni di reazione:

$Pd(PPh_3)_4$, K_2CO_3 , DME, H_2O , MW, $130^\circ C$, 5 min, rese: 43% **5m**; 50% **5p**.

4.1.4 ULTERIORI OSSERVAZIONI

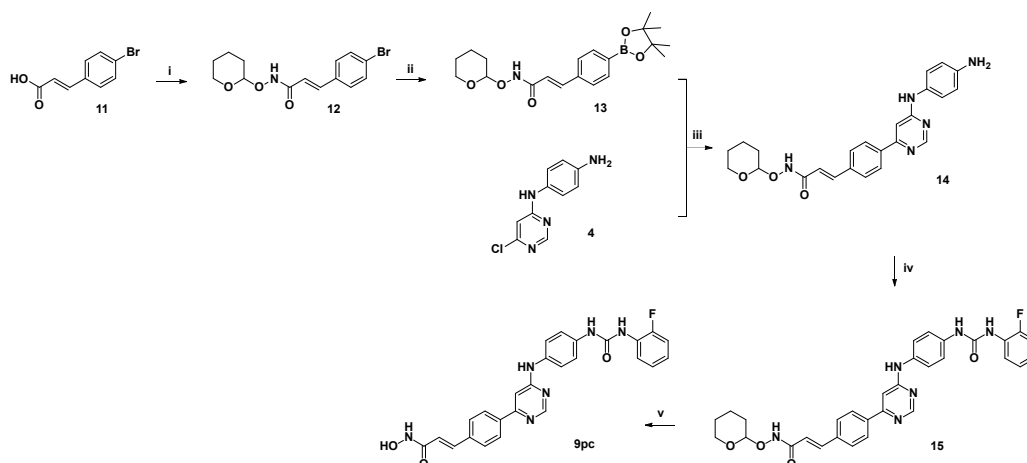
Le rimanenti reazioni riportate nello schema sintetico generale (*Schema 1*) non hanno dimostrato particolari criticità durante lo svolgimento dell'intero processo sintetico.

La solubilità dei diversi intermedi e prodotti finali si è tuttavia rivelata essere un fattore degno di nota durante la loro realizzazione. I composti con isomeria *meta* sono risultati infatti molto più solubili se paragonati ai corrispettivi analoghi *para*-sostituiti. Questo dato potrà risultare rilevante per la razionalizzazione dell'attività biologica delle diverse molecole ottenuta mediante i test *in vitro* e *in vivo*. Tutti i prodotti finali si sono rivelati poco solubili in metanolo, caratteristica sfruttata per l'isolamento del prodotto di interesse dalla miscela di reazione durante l'ultimo step sintetico.

A causa di questa scarsa solubilità, riscontrata sia in acqua che in solventi organici, non è stato possibile purificare i prodotti di interesse mediante cromatografia su gel di silice. Per ovviare a questo problema, piccole aliquote di composto finale sono state purificate mediante HPLC preparativa, utilizzando una fase stazionaria RP-C18 e sfruttando un'eluizione a gradiente realizzata mediante miscela Acqua/Acetonitrile (Acetonitrile 10% → 90% in 30 minuti).

4.2 VIA SINTETICA CONVERGENTE

4.2.1 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-{6''-[4'''-[2^{IV}-FLUOROFENILUREIDO) FENIL]PIRIMID-4''-ILAMMINO}PROP-2-ENAMMIDE



Schema 6. Via sintetica convergente. Condizioni di reazione:

i) NH_2OTHP , EDC, HOBT, NEt_3 , DMSO, R.T., 16h, resa 93%.

ii) B_2Pin_2 , $\text{Pd}(\text{dppf})\text{Cl}_2$, CH_3COOK , DMF, 70°C , 2h, resa 78%.

iii) $\text{Pd}(\text{PPh}_3)_4$, K_2CO_3 , DME, H_2O , riflusso, 1h, resa 33%.

iv) arilisocianato, DMF, R.T., 6 h, resa 86%.

v) HCl, MeOH, R.T., 2h, resa quantitativa.

La sintesi di **9pc** (Schema 6) è stata compiuta seguendo una via sintetica alternativa. Tale via è stata progettata al fine di migliorare i tempi necessari alla realizzazione di un'ipotetica libreria di composti simili tra loro, traendo vantaggio dai principi della sintesi convergente.

Questa nuova via non ha previsto lo step di protezione della funzione carbossilica come estere e la successiva deprotezione (step "v" nello Schema 1). Come prima reazione, infatti, è stato effettuato il coupling con l'idrossilammina protetta come *O*-tetraidropiranile. Tuttavia, il coupling di Suzuki (step "iii" nello Schema 6) è risultato essere particolarmente critico. Infatti, nelle condizioni di reazione utilizzate, il gruppo *O*-tetraidropiranile, ha mostrato particolare instabilità chimica. Di conseguenza, la resa di reazione per tale step non è mai risultata superiore al 35%. I tentativi di migliorare la resa della reazione, rendendo meno aggressive le condizioni, non hanno portato

all'ottenimento del prodotto desiderato in quantità sufficienti per rendere il processo economicamente conveniente. Ciononostante, le quantità di prodotto ottenute tramite le reazioni di prova hanno permesso la sintesi del composto **9pc** in quantità sufficienti per i test biologici.

Tutti i composti sono stati caratterizzati tramite spettroscopia NMR del protone. Inoltre, tutti i composti finali sono stati purificati tramite HPLC preparativo e caratterizzati tramite HRMS. I composti sintetizzati saranno a breve sottoposti a saggi di valutazione biologica su un pannello di chinasi isolate, sugli HDAC isolati e su specifiche linee cellulari tumorale umane.

I composti sintetizzati sono rappresentati in *Figura 22* e riassunti in *Tabella 1*.

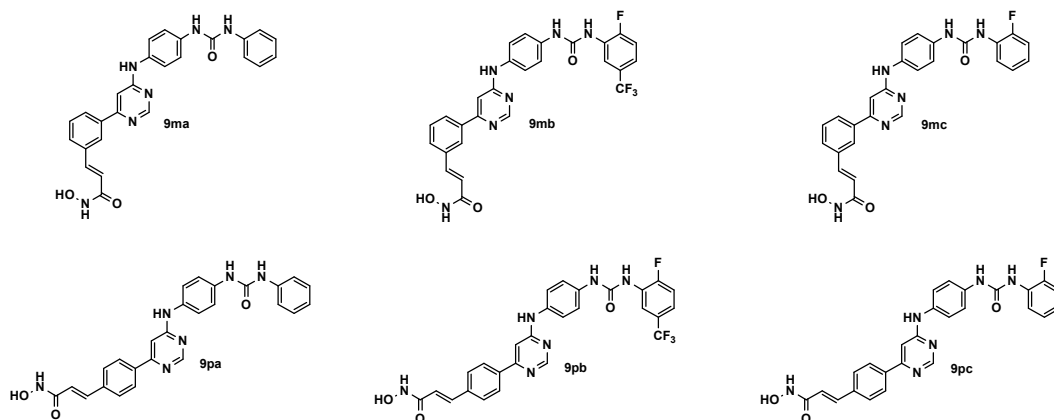


Figura 22. Composti sintetizzati

	R ₁	R ₂	Iso
9ma	H	H	m
9mb	F	CF ₃	m
9mc	F	H	m
9pa	H	H	p
9pb	F	CF ₃	p
9pc	F	H	p

Tabella 1. Legenda dei prodotti finali sintetizzati

5. PARTE SPERIMENTALE

5.1 MATERIALI

I prodotti ed i reagenti impiegati (Acros ed Aldrich) sono stati utilizzati come tali, senza ulteriori 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 60 F₂₄₅ (0.2 mm, Merck), eluendo come indicato volta per volta.

La cromatografia su colonna è stata eseguita utilizzando gel di silice 60 (0.063-0.100 mm, Merck), eluendo con i solventi di volta in volta indicati.

5.2 STRUMENTAZIONI

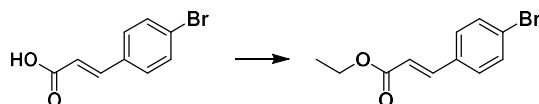
Gli spettri $^1\text{H-NMR}$ sono stati eseguiti con spettrometro Bruker 300-AMX, utilizzando TMS come standard interno ($\delta=0$) ed i solventi deuterati di volta in volta indicati; i valori di assorbimento sono espressi in δ e le costanti in Hz.

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.

5.3 METODI

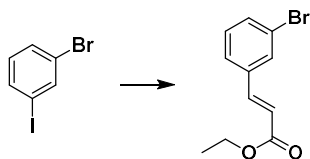
5.3.1 SINTESI DI ETILE BROMOCINNAMOATO

Sintesi di etile (E)-4-bromocinnamoato



Ad una sospensione di acido 4-bromocinnamico (0.2 g, 1.0mmol) in etanolo (5mL) è stato aggiunto acido solforico (24.0 μ L). La miscela di reazione è stata dunque posta a riflusso per 16 ore. A reazione completa (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 95/5), l'etanolo è stato rimosso per evaporazione a pressione ridotta ed il residuo così ottenuto è stato ripreso con EtOAc (15mL). La soluzione organica così ottenuta è stata dunque lavata con soluzione satura di NaHCO₃ (3 x 5mL). La fase organica è stata poi anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente eliminato per evaporazione a pressione ridotta, ottenendo in tal modo l'**etile (E)-4-bromocinnamoato** come olio incolore (0.3g, resa quantitativa).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.61 (d, J=15.9, 1H, 2-H); 7.52 (d, J=8.7, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.38 (d, J=8.7, 2H, 2'-H e 6'-H); 6.42 (J=15.9, 1H, 3-H); 4.26 (q, J=7.2, 2H, CH₂); 1.34 (t, J=7.2, 3H, CH₃).

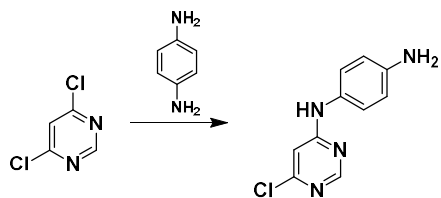
Sintesi di etile (E)-3-bromocinnamoato

A due soluzioni di 1-bromo-3-iodobenzene (0.6mL, 5.0mmol) in NMP (10mL) poste in fiala chiusa sotto atmosfera d'azoto sono stati aggiunti in sequenza TEA (0.9mL, 6.3mmol), etile acrilato (0.6mL, 5.5mmol) e palladio diacetato (0.1g, 0.5mmol). Le fiale contenenti le due soluzioni sono state coperte con foglio di alluminio per evitare l'esposizione alla luce ambientale. Le due soluzioni sono state poste in bagno ad olio termostato a 80°C per 2.5 ore. A reazione completa (TLC: CE/EtOAc, 8/2) le due soluzioni così ottenute sono state versate goccia a goccia in HCl 0.1M (250mL). La fase acquosa è stata successivamente estratta con EtOAc (3 x 100mL), anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente è stato eliminato per evaporazione a pressione ridotta. L'olio bruno così ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (CE/EtOAc, 95/5), ottenendo **etile (E)-3-bromocinnamoato** (2.2g, resa 87%).

H-NMR (CDCl₃-d): 7.67 (t, J=1.7, 1H, 2'-H); 7.6 (d, J=16.1, 1H, 2-H); 7.51 (ddd, J=7.9, J=1.7, J=1.1, 1H, 4'-H); 7.44 (dt, J=7.9, J=1.1, 1H, 6'-H); 7.26 (t, J=7.9, 1H, 5'-H); 6.43 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.27 (q, J= 7.0, 2H, CH₂); 1.33 (t, J=7.0, 3H, CH₃).

5.3.2 SINTESI DELLA PORZIONE 4-ANILINOPIRIMIDINICA COMUNE

Sintesi di 4-(6'-cloropirimidin-4'-ilammino)anilina



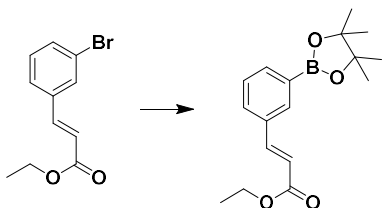
A cinque soluzioni di 4,6-dicloropirimidina (0.2g, 1mmol) in iso-propanolo (3mL) è stata aggiunta *p*-fenilendiammina (0.1g, 1.1mmol) e TEA (0.3mL, 2.0mmol). Le soluzioni (sotto atmosfera di azoto, flussato per 5 minuti) sono state irradiate in microonde ad 80 W, raggiungendo la temperatura di 80 °C mantenuta per 20 minuti (TLC: EtOAc/EtOH, 95/5). Le quattro miscele di reazione sono state dunque diluite in una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (150mL) ed estratte con EtOAc (3 x 50mL). La fase organica così ottenuta è stata lavata con una soluzione acquosa satura di NaHCO₃ (2 x 80mL) e successivamente con una soluzione acquosa satura di NH₄Cl (3 x 70mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e concentrata a secchezza, ottenendo la **4-(6'-cloropirimidin-4'-ilammino)anilina** (0.9g, resa 81%).

¹H-NMR (CDCl₃-*d*): 8.39 (s, 1H, 2'-H); 7.05 (d, J=8.5, 2H, 2-H e 6-H); 6.77 (s all, 1H, NH); 6.72 (d, J=8.5, 2H, 3-H e 5-H); 6.45 (s, 1H, 5'-H); 3.77 (s all, 2H, NH₂).

5.3.3 SINTESI DEI COMPOSTI POSSEDENTI ISOMERIA META

5.3.3.1 SINTESI DI ETILE (E)-3'-[6''-(4'''-AMMINOFENIL)-PIRIMID-4''-ILAMMINO] FENILPROP-2-ENOATO

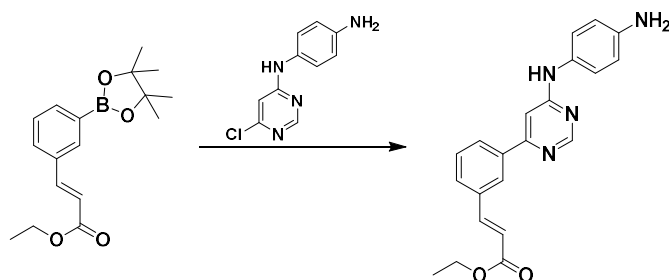
Sintesi di etile (E)-3-boropinacolcinnamoato



In un pallone a due colli sono stati aggiunti in successione i seguenti reattivi solidi: l'etile (E)-3-bromocinnamoato (2.1g, 8.3mmol) bispinacolato di diboron (3.2g, 12.4mmol), acetato di potassio (3.3g, 33.2mmol) e palladio difenilfosfinoferrocenedicloruro (0.2g, 0.3mmol). L'atmosfera nel pallone è stata ricondizionata mediante 3 cicli ripetuti di vuoto/azoto, al termine dei quali è stato aggiunto diossano (42mL) all'interno del pallone. La miscela di reazione è stata quindi posta in agitazione in bagno ad olio termostato a 80°C per 21 ore (TLC: CE/EtOAc, 9/1). A reazione completa, è stata diluita in 100mL di EtOAc e successivamente lavata con una soluzione satura di NaCl. La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente organico è stato dunque eliminato per evaporazione a pressione ridotta. L'olio ottenuto è stato purificato mediante cromatografia su gel di silice (n-esano/EtOAc, 9/1), ottenendo in tal modo **etile (E)-3-boropinacolcinnamoato** (2.7g, resa quantitativa).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.99 (s all, 1H, 2'-H); 7.81 (dt, J=7.5, J=1.1, 1H, 6'-H); 7.70 (d, J=16.1, 1H, 2-H); 7.60 (dt, J=7.5, J=1.1, 1H, 4'-H); 7.39 (t, J=7.5, 1H, 5'-H); 6.49 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.26 (q, J=7.2, 2H, CH₂); 1.35 (s, 12H, pinacolato); 1.33 (t, J=7.2, 3H, CH₃).

Sintesi di etile (E)-3'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato

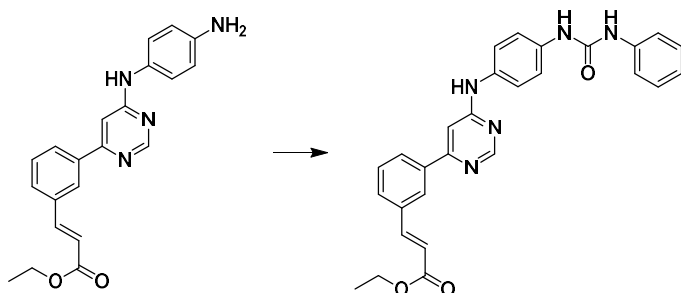


A sette soluzioni di etile (E)-3-boropinacolcinnamoato (0.4g, 1.2mmol) in dimetossietano (3mL) sono stati aggiunti in sequenza 4-(6'-cloropirimidin-4'-ilammino)anilina (0.2g, 1.0mmol), una soluzione al 10% di NaHCO₃ (3mL) e tetrakis(trifenilfosfina)palladio⁰ (30.0mg, 30.0μmol). Le sospensioni così ottenute sono state degassate mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente irradiate a microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 130° C mantenuta per 5 minuti, sfruttando la regolazione automatica della potenza e del raffreddamento dello strumento (TLC: CE/EtOAc, 2/8). Le miscele di reazione sono state dunque precipitate in una soluzione satura di NaCl (300mL). Il precipitato così ottenuto è stato raccolto per filtrazione e purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (CHCl₃ 100%), ottenendo l'**etile (E)-3'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato** (1.2g, resa 43%).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.70 (s, 1H, 2''-H); 8.08 (s all, 1H, 2'-H); 7.90 (d, J=8.1, 1H, 4'-H); 7.73 (d, J=16.1, 1H, 2-H); 7.62 (d, J=8.1, 1H, 6'-H); 7.46 (t, J=8.1, 1H, 5'-H); 7.13 (d, J=8.3, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.06 (s all, 1H, NH); 6.87 (s, 1H, 5''-H); 6.75 (d, J=8.3, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 6.52 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.27 (q, J=7.4, 2H, CH₂); 1.34 (t, J=7.4, 3H, CH₃).

5.3.3.2 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-{6''-[4'''-(FENILUREIDIO)FENIL]PIRIMID-4''-ILAMMINO}PROP-2-ENAMMIDE

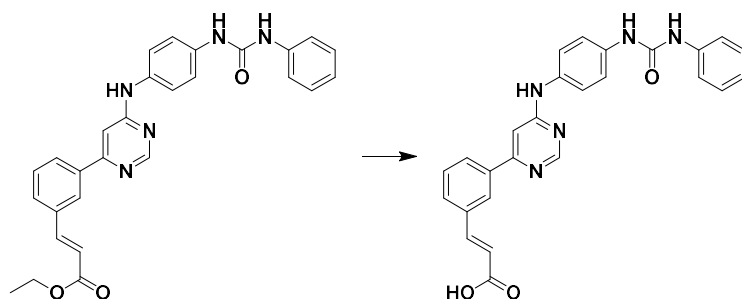
Sintesi di etile (E)-3'-[6''-(4'''-(fenilureidio)fenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato



Ad una soluzione di etile (E)-3'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (0.3g, 0.7mmol) in DMF (1mL), posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di fenilisocianato (80.0μL, 0.8mmol) in DMF (1mL). La sospensione gialla così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente posta in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). La miscela di reazione è stata dunque diluita in una soluzione satura di NaCl (40mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione. Il solido così ottenuto è stato risospeso in acetonitrile (7mL) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è **etile (E)-3'-[6''-(4'''-(fenilureidio)fenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato** (0.3g, resa 80%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.58 (s, 1H, NH); 8.69 (s all, 1H, 2''-H); 8.64 (s all, 2H, NH); 8.29 (s all, 1H, 2'-H); 8.06 (d, J=7.7, 1H, 4'-H); 7.89 (d, J=7.7, 1H, 6'-H); 7.76 (d, J=16.2, 1H, 2-H); 7.62-7.56 (m, 3H, 2'''-H, 6'''-H e 5'-H); 7.48-7.43 (m, 4H, 3'''-H, 5'''-H e 2H^{IV}); 7.31-7.24 (m, 3H, 5''-H e 2H^{IV}); 6.96 (t, J=7.6, 1H, 3^{IV}-H); 6.73 (d, J=16.2, 1H, 3-H); 4.22 (q, J=7.4, 2H, CH₂); 1.27 (t, J=7.4, 3H, CH₃).

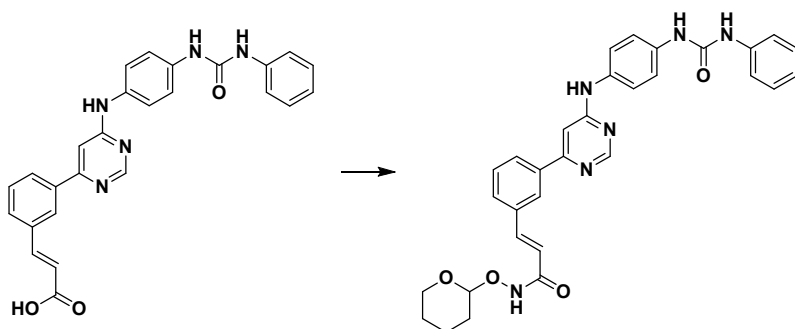
Sintesi di acido (E)-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico



Ad una sospensione di etile (E)-3'-[6''-(4'''-(fenilureidio)fenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (0.3g, 0.6mmol) in THF (6mL) è stata aggiunta una soluzione di NaOH 0.2M (7mL). La miscela così ottenuta è stata lasciata in agitazione a 50°C per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Il solvente organico è stato parzialmente eliminato per evaporazione a pressione ridotta e la sospensione così ottenuta è stata successivamente acidificata con HCl 1M (13mL). Il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione, risospeso in ACN (6mL), e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è l'acido (E)-3'-[6''-(4'''-(fenilureidio)fenil)pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoico (0.2g, resa 97%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.58 (s, 1H, NH); 9.33 (s all, 2H, NH); 8.69 (s all, 1H, 2''-H); 8.24 (s all, 1H, 2'-H); 8.02 (d, J=7.7, 1H, 4'-H); 7.80 (d, J=7.7, 1H, 6'-H); 7.63-7.47 (m, 8H, 2-H, 2'''-H, 6'''-H, 3'''-H, 5'''-H, 5'-H e 2H^{IV}); 7.30-7.24 (m, 3H, 5'-H e 2H^{IV}); 6.94 (t, J=7.6, 1H, 3^{IV}-H); 6.63 (d, J=16.2, 1H, 3-H).

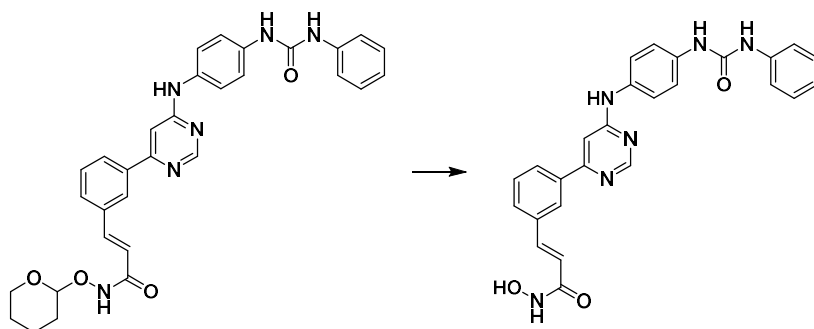
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^v-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di acido (E)-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico (0.3g, 0.5mmol) in DMSO (5mL) sono stati aggiunti in sequenza TEA (0.1mL, 0.8mmol), EDC (0.2g, 0.9mmol) e HOBT (90.0mg, 0.7mmol). La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per 1 ora e mezza, fino alla completa attivazione dell'acido (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Successivamente è stato aggiunto NH₂OTHP (80mg, 0.7mmol) e la soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina). La miscela di reazione così ottenuta è stata precipitata in soluzione satura di NaCl (110mL) ed il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato tramite cromatografia in gel di silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5), ottenendo (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^v-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (0.3g, resa 88%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.27 (s all, 1H, NHO); 9.60 (s, 1H, NH); 8.69 (s all, 1H, 2''-H); 8.62 (s all, 2H, NH); 8.27 (s all, 1H, 2'-H); 7.99 (d, J=7.7, 1H, 4'-H); 7.72 (d, J=7.7, 1H, 6'-H); 7.62-7.56 (m, 4H, 2'''-H e 6'''-H, 2-H e 5'-H); 7.47-7.42 (m, 4H, 3'''-H e 5'''-H, e 2H^{IV}); 7.28 (t, J=8.1, 2H, 2H^{IV}); 7.22 (s all, 1H, 5''-H); 6.97 (t, J=7.6, 1H, 3^{IV}-H); 6.65 (d, J=16.2, 1H, 3-H); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.01-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂).

Sintesi di (E)-N-idrossi-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enamide



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enamide (0.3g, 0.5mmol) in CH₂Cl₂/CH₃OH in rapporto 1/1 (38mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl 1M (4mL). La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione per 16 ore a temperatura ambiente. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina), si è ottenuto un precipitato arancione raccolto per filtrazione e purificato tramite HPLC preparativo RP-C18 ottenendo in tal modo **(E)-N-idrossi-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enamide** (0.2g, resa 77%).

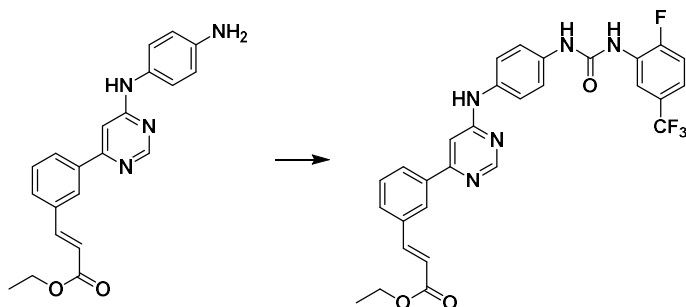
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.19 (s all, 1H, NHO); 8.78 (s, 1H, NH); 8.77 (s, 1H, NH); 8.73 (s all, 1H, 2''-H); 8.18 (s all, 1H, 2'-H); 7.92 (d, J=7.7, 1H, 4'-H); 7.76 (d, J=7.7, 1H, 6'-H); 7.63-7.43 (m, 8H, 2'''-H, 6'''-H, 3'''-H, 5'''-H, 2-H, 5'-H e 2H^{IV}); 7.28 (t, J=8.1, 2H, 2H^{IV}); 7.21 (s all, 1H, 5''-H); 6.97 (t, J=7.6, 1H, 3^{IV}-H); 6.60 (d, J=16.1, 1H, 3-H).

HRMS ESI-TOF (M+H⁺): Calcolato: 467.1826 uma

Trovato: 467.1677 uma

5.3.3.3 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-FLUORO-5^{IV}(TRIFLUOROMETIL)-FENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE

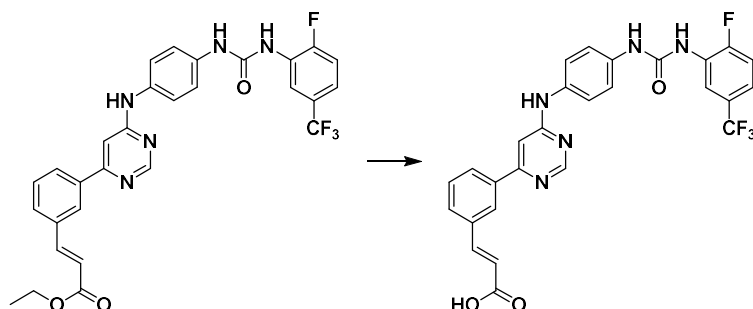
Sintesi di etile (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato



Ad una soluzione di etile (E)-3'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (0.2g, 0.6mmol) in DMF (2mL), posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 2-Fluoro-5-(trifluorometil)fenilisocianato (90.0μL, 0.6mmol) in DMF (1mL). La soluzione gialla così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente posta in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 95/5). La miscela di reazione è stata dunque diluita in una soluzione satura di NaCl (30mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione. Il solido così ottenuto è stato risospeso in acetonitrile (7mL) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è l'**etile (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato** (0.3g, resa 84%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.63 (s, 1H, NH); 9.14 (s, 1H, NH); 8.86 (d, J=2.8, 1H, NH); 8.70 (s, 1H, 2''-H); 8.64 (dd, J=7.2, J=2.5, 1H, 4^{IV}-H); 8.29 (s all, 1H, 2'-H); 8.05 (d, J=8.1, 1H, 4'-H); 7.86 (d, J=8.1, 1H, 6'-H); 7.76 (d, J=16.1, 1H, 2-H); 7.66-7.43 (m, 6H, 2'''-H, 6'''-H, 3'''-H, 5'''-H, 5'-H, 2^{IV}-H); 7.42-7.34 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.26 (s, 1H, 5''-H); 6.73 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.27 (q, J=7.4, 2H, CH₂); 1.34 (t, J=7.4, 3H, CH₃).

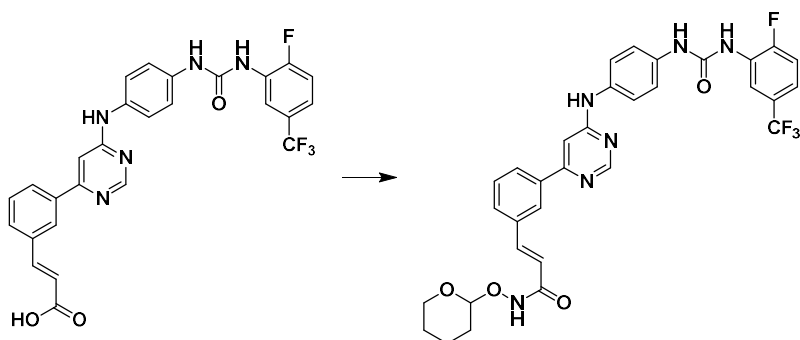
Sintesi di acido (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico



Ad una soluzione di etile (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-2^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato (0.3g, 0.5mmol) in THF (5mL) è stata aggiunta una soluzione di NaOH 0.2M (5mL). La miscela così ottenuta è stata lasciata in agitazione a 50°C per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Il solvente organico è stato parzialmente eliminato per evaporazione a pressione ridotta e la sospensione così ottenuta è stata successivamente acidificata con HCl 1M (9mL). Il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione, risospeso in ACN (6mL), e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è l'**acido (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico** (0.2g, resa 87%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.73 (s, 1H, NH); 9.60 (s all, 1H, NH); 9.28 (s all, 1H, NH); 8.70 (s, 1H, 2''-H); 8.60 (dd, J=7.5, J=1.9, 1H, 4^{IV}-H); 8.21 (s all, 1H, 2'-H); 8.00 (d, J=8.1, 1H, 4'-H); 7.75 (d, J=8.1, 1H, 6'-H); 7.64 (d, J=8.9, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.57-7.44 (m, 5H, 2-H, 2'''-H e 6'''-H, 5'-H, 3^{IV}-H); 7.40-7.35 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.31 (s all, 1H, 5''-H); 6.73 (d, J=16.1, 1H, 3-H).

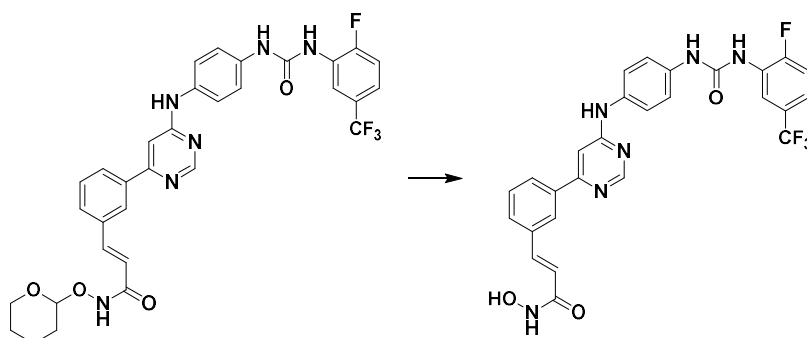
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di acido (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico (0.2g, 0.4mmol) in DMSO (4mL) sono stati aggiunti in sequenza TEA (80.0μL, 0.6mmol), EDC (0.1g, 0.7mmol) e HOBT (60.0mg, 0.5mmol). La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per 1 ora e mezza, fino alla completa attivazione dell'acido (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Successivamente è stato aggiunto NH₂OTHP (60mg, 0.5mmol) e la soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina). La miscela di reazione così ottenuta è stata precipitata in soluzione satura di NaCl (100mL) ed il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato tramite cromatografia in gel di silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5), ottenendo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide** (0.2g, resa 88%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.26 (s, 1H, NHO); 9.65 (s, 1H, NH); 9.18 (s all, 1H, NH); 8.89 (s all, 1H, NH); 8.70 (s, 1H, 2''-H); 8.64 (d, J=7.0, 1H, 4^{IV}-H); 8.27 (s all, 1H, 2'-H); 7.99 (d, J=8.1, 1H, 4'-H); 7.71 (d, J=8.1, 1H, 6'-H); 7.68-7.42 (m, 7H, 2'''-H, 6'''-H, 3'''-H, 5'''-H, 2-H, 5'-H, 3^{IV}-H); 7.40-7.35 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.22 (s all, 1H, 5''-H); 6.73 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.01-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂).

Sintesi di (E)-N-idrossi-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (0.2g, 0.3mmol) in CH₂Cl₂/CH₃OH in rapporto 1/1 (20mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl 1M (3mL). La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione per 16 ore a temperatura ambiente. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina) si è ottenuto un precipitato giallo che è stato raccolto per filtrazione e purificato tramite HPLC preparativo RP-C18 ottenendo in tal modo (E)-N-idrossi-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (0.2g, resa 79%).

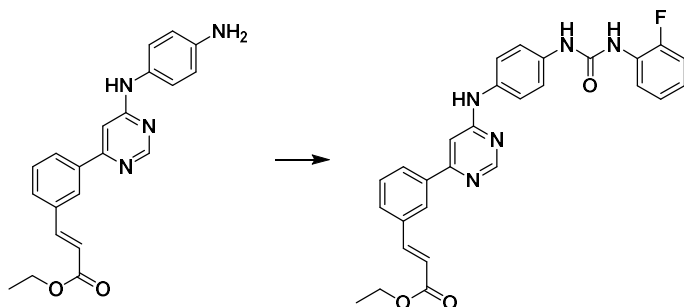
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.03 (s, 1H, NHO); 9.18 (s, 1H, NH); 8.87 (d, J=2.5, 1H, NH); 8.76 (s, 1H, 2''-H); 8.64 (dd, J=7.0, J=1.8, 1H, 4^{IV}-H); 8.20 (s all, 1H, 2'-H); 7.94 (d, J=8.1, 1H, 4'-H); 7.74 (d, J=8.1, 1H, 6'-H); 7.65-7.45 (m, 7H, 2'''-H, 6'''-H, 3'''-H, 5'''-H, 2-H, 5'-H, 3^{IV}-H); 7.41-7.36 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.22 (s all, 1H, 5''-H); 6.59 (d, J=15.8, 1H, 3-H).

HRMS ESI-TOF (M+H⁺): Calcolato: 553.1606 uma

Trovato: 553.0939 uma

5.3.3.4 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-FLUOROFENILUREIDIO)FENIL]PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE

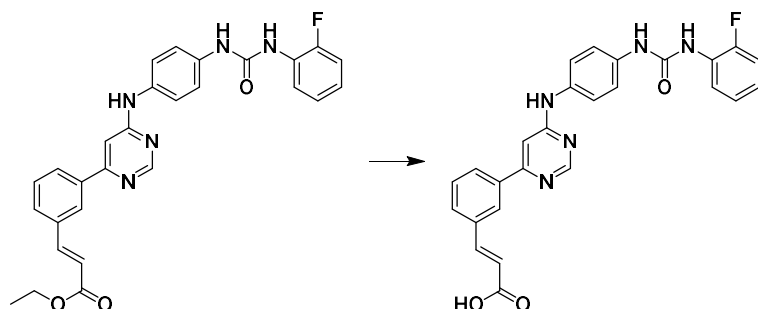
Sintesi di etile (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato



Ad una soluzione di etile (E)-3'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (0.3g, 0.7mmol) in DMF (1mL), posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 2-Iodofenilisocianato (90.0µL, 0.8mmol) in DMF (1mL). La soluzione gialla così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente posta in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 95/5). La miscela di reazione è stata dunque diluita in una soluzione satura di NaCl (40mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione. Il solido così ottenuto è stato risospeso in acetonitrile (7mL) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è **etile (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato** (0.3g, resa 84%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.59 (s, 1H, NH); 9.03 (s, 1H, NH); 8.69 (s, 1H, 2''-H); 8.51 (d, 1H, J=2.5, NH); 8.29 (s all, 1H, 2'-H); 8.17 (t, J=8.8, 1H, H^{IV}); 8.06 (d, J=7.4, 1H, 4'-H); 7.88 (d, J=7.4, 1H, 6'-H); 7.71 (d, J=16.1, 1H, 2-H); 7.64-7.54 (m, 3H, 2'''-H, 6'''-H e 5'-H); 7.44 (d, J=8.4, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.26-7.19 (m, 2H, H^{IV} e 5''-H); 7.14 (t, 1H, J=7.7, H^{IV}); 7.03-6.97 (m, 1H, H^{IV}); 6.72 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.21 (q, J=7.2, 2H, CH₂); 1.27 (t, J=7.2, 3H, CH₃).

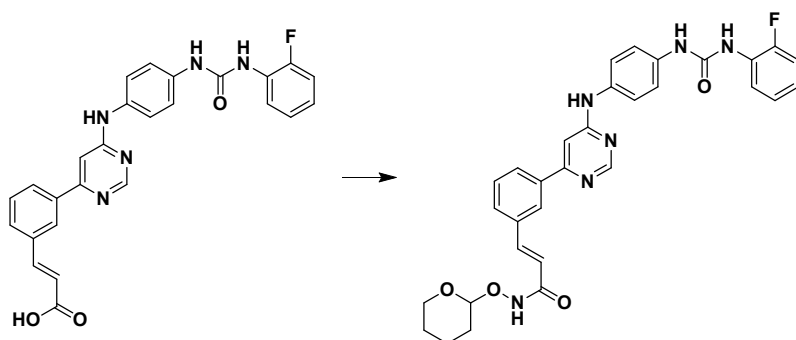
Sintesi di acido (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico



Ad una sospensione di etile (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato (0.3g, 0.6mmol) in THF (6mL) è stata aggiunta una soluzione di NaOH 0.2M (7mL). La miscela così ottenuta è stata lasciata in agitazione a 50°C per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Il solvente organico è stato parzialmente eliminato per evaporazione a pressione ridotta e la sospensione così ottenuta è stata successivamente acidificata con HCl 1M (14mL). Il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione, risospeso in ACN (6mL), e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è l'acido (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico (0.3g, resa 95%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.59 (s, 1H, NH); 9.03 (s, 1H, NH); 8.69 (s, 1H, 2''-H); 8.51 (d, 1H, J=2.5, NH); 8.26 (s all, 1H, 2'-H); 8.17 (t, J=8.8, 1H, H^{IV}); 8.04 (d, J=7.4, 1H, 4'-H); 7.84 (d, J=7.4, 1H, 6'-H); 7.69 (d, J=16.1, 1H, 2-H); 7.64-7.54 (m, 3H, 2'''-H, 6'''-H e 5'-H); 7.44 (d, J=8.8, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.26-7.19 (m, 2H, H^{IV} e 5''-H); 7.14 (t, 1H, J=7.7, H^{IV}); 7.03-6.97 (m, 1H, H^{IV}); 6.62 (d, J=16.1, 1H, 3-H).

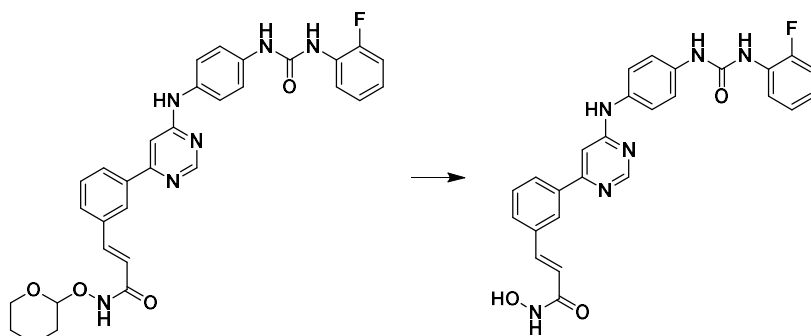
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^v-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(2^{iv}-fluorofenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di acido (E)-3'-{6''-[4'''-(2^{iv}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico (0.2g, 0.4mmol) in DMSO (6mL) sono stati aggiunti in sequenza TEA (0.1mL, 0.9mmol), EDC (0.2g, 1.0mmol) e HOBT (90mg, 0.7mmol). La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per 1 ora e mezza, fino alla completa attivazione dell'acido (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Successivamente è stato aggiunto NH₂OTHP (80mg, 0.7mmol) e la soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina). La miscela di reazione così ottenuta è stata precipitata in soluzione satura di NaCl (110mL) ed il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato tramite cromatografia in gel di silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5), ottenendo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^v-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(2^{iv}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide** (0.2g, resa 74%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.26 (s, 1H, NH); 9.61 (s, 1H, NH); 9.04 (s, 1H, NH); 8.69 (s, 1H, 2''-H); 8.51 (d, 1H, J=2.5, NH); 8.26 (s all, 1H, 2'-H); 8.17 (t, J=8.8, 1H, H^v); 7.98 (d, J=7.7, 1H, 4'-H); 7.71 (d, J=7.7, 1H, 6'-H); 7.64-7.54 (m, 4H, 2'''-H, 6'''-H e 5'-H, 2-H); 7.44 (d, J=8.8, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.26-7.19 (m, 2H, H^v e 5''-H); 7.14 (t, 1H, J=7.7, H^v); 7.03-6.97 (m, 1H, H^v); 6.65 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.01-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂).

Sintesi di (E)-N-idrossi-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (0.2g, 0.4mmol) in CH₂Cl₂/CH₃OH in rapporto 1/1 (34mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl 1M (3mL). La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione per 16 ore a temperatura ambiente. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina), si è ottenuto un precipitato arancione raccolto per filtrazione e purificato tramite HPLC preparativo RP-C18 ottenendo in tal modo (E)-N-idrossi-3'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (0.2g, resa 83%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.14 (s, 1H, NHO); 9.10 (s, 1H, NH); 8.78 (s, 1H, 2''-H); 8.54 (d, 1H, J=2.3, NH); 8.20-8.13 (m, 2H, 2'-H, H^{IV}); 7.92 (d, J=7.7, 1H, 4'-H); 7.75 (d, J=7.7, 1H, 6'-H); 7.64-7.58 (m, 3H, 2'''-H, 6'''-H e 5'-H); 7.55 (d, J=15.7, 1H, 2-H); 7.48 (d, J=8.8, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.26-7.20 (m, 2H, H^{IV} e 5''-H); 7.14 (t, 1H, J=7.7, H^{IV}); 7.03-6.97 (m, 1H, H^{IV}); 6.60 (d, J=15.7, 1H, 3-H).

HRMS ESI-TOF (M+H⁺): Calcolato: 485.1732 uma

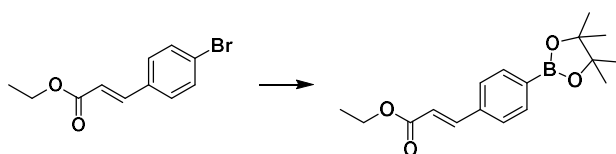
Trovato: 485.1745 uma

5.3.4 SINTESI DEI COMPOSTI POSSEDENTI ISOMERIA PARA

5.3.4.1 METODO PROGRESSIVO

5.3.4.1.1 SINTESI DI ETILE (E)-4'-[6''-(4'''-AMMINOFENIL)-PIRIMID-4''-ILAMMINO]FENILPROP-2-ENOATO

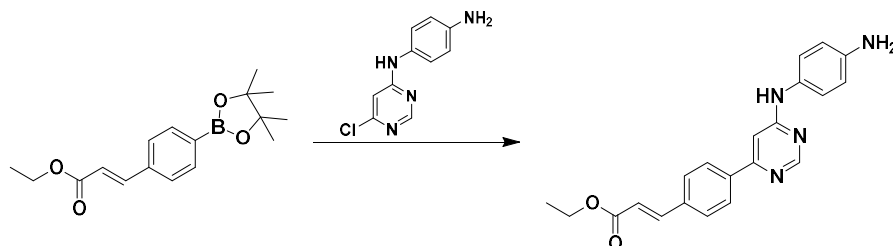
Sintesi di etile (E)-4-boropinacolcinnamoato



Ad una soluzione di etile (E)-4-bromocinnamoato (0.1g, 0.5mmol) in DMF (1mL) sono stati aggiunti in sequenza acetato di potassio (0.2g, 1.5mmol), palladio difenilfosfinoferrocenedicloruro (0.02g, 0.025mmol) e bispinacolato di diboron (0.1g, 0.5mmol). La miscela di reazione è stata successivamente posta in bagno ad olio preriscaldato a 70°C per 2.5 ore. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂ 100%), la miscela di reazione è stata diluita in una soluzione satura di NaCl (40mL) ed estratta con EtOAc (15 x 3mL). Successivamente la fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente eliminato per evaporazione a pressione ridotta. La miscela di composti così ottenuta è stata purificata mediante cromatografia su gel di silice con eluente 100% CH₂Cl₂, ottenendo in tal modo l'etile (E)-4-boropinacolcinnamoato (0.1g, resa 82%).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 7.81 (d, J=8.1, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.68 (d, J=16.4, 1H, 2-H); 7.45 (d, J=8.1, 2H, 2'-H e 6'-H); 6.42 (J=16.4, 1H, 3-H); 4.20 (q, J=7.4, 2H, CH₂); 1.28 (s, 12H, pinacolato); 1.27 (t, J=7.4, 3H, CH₃).

Sintesi di etile (E)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato

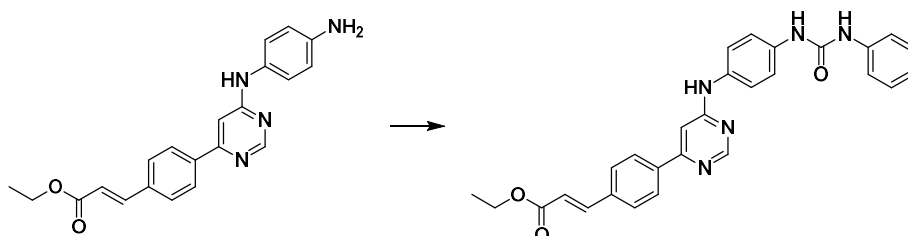


Ad una soluzione di etile (E)-4-boropinacolcinnamoato (0.1g, 0.4mmol) in dimetossietano (1mL) sono stati aggiunti in sequenza 4-(6'-cloropirimidin-4'-ilammino)anilina (70mg, 0.3mmol), una soluzione al 10% di NaHCO₃ (1mL) e tetrakis(trifenilfosfina)palladio⁰ (20mg, 16.0μmol). La sospensione così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente irradiata a microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 130° C mantenuta per 5 minuti, sfruttando la regolazione automatica della potenza e del raffreddamento dello strumento (TLC: CE/EtOAc, 2/8). La miscela di reazione è stata dunque precipitata in una soluzione satura di NaCl (15mL). Il precipitato così ottenuto è stato raccolto per filtrazione e purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (CE/EtOAc, 3/7), ottenendo l'etile (E)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (60.0mg, resa 56%).

¹H-NMR (CDCl₃-d): 8.69 (d, J=0.9, 1H, 2''-H); 7.93 (d, J=8.3, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.70 (d, J=16.0, 1H, 2-H); 7.58 (d, J=8.3, 2H, 4'-H e 6'-H); 7.13 (d, J=8.6, 2H, 2'''-H e 6-H'''); 6.87 (d, J=0.9, 1H, 5''-H); 6.75 (d, J=8.6, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 6.69 (s all, 1H, NH); 6.48 (d, J=16.0, 1H, 3-H); 4.27 (d, J=6.8, 2H, CH₂); 3.76 (s all, 2H, NH₂); 1.34 (t, J=6.8, 3H, CH₃).

5.3.4.1.2 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-{6''-[4'''-(FENILUREIDIO)FENIL]PIRIMID-4''-ILAMMINO}PROP-2-ENAMMIDE

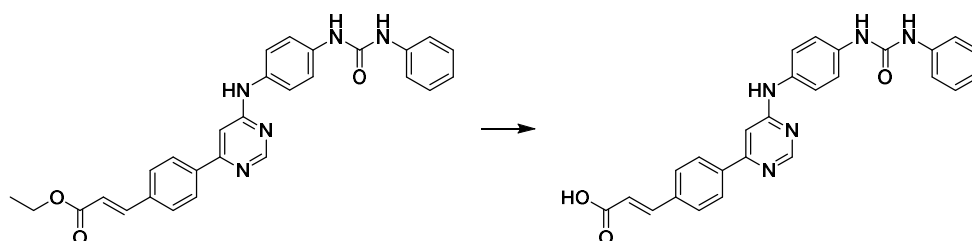
Sintesi di etile (E)-4'-[6''-(4'''-(fenilureidio)fenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato



Ad una soluzione di etile (E)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (0.1g, 0.4mmol) in DMF (1mL), posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di Fenilisocianato (50.0μL, 0.4mmol) in DMF (1mL). La sospensione gialla così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente posta in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). La miscela di reazione è stata dunque diluita in una soluzione satura di NaCl (30mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione. Il solido così ottenuto è stato successivamente risospeso in acetonitrile (10mL) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è **etile (E)-4'-[6''-(4'''-(fenilureidio)fenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato** (0.2g, resa 85%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.61 (s, 1H, NH); 8.68 (d, J=0.8, 1H, 2-H''); 8.64 (s, 1H, NH); 8.63 (s, 1H, NH); 8.06 (d, J=8.5, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.88 (d, J=8.5, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.72 (d, J=16.1, 1H, 2-H); 7.60 (d, J=9.1, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.48-7.41 (m, 4H, 2^{IV}-H, 6^{IV}-H, 2'-H e 5'-H); 7.28 (t, J=7.7, 2H, 3^{IV}-H e 5^{IV}-H); 7.21 (d, J=0.8, 1H, 5-H''); 6.96 (tt, J=7.2, J=1.3, 1H, 4-H^{IV}); 6.73 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.22 (q, J=7.2, 2H, CH₂); 1.28 (t, J=7.2, 3H, CH₃).

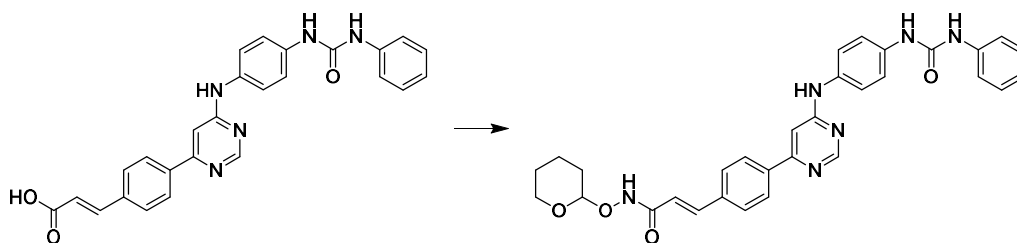
Sintesi di acido (E)-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino} fenilprop-2-enoico



Ad una sospensione di etile (E)-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoato (0.2g, 0.4mmol) in THF (4mL) è stata aggiunta una soluzione di NaOH 0.2M (4mL). La miscela così ottenuta è stata lasciata in agitazione a 50°C per 72 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Il solvente organico è stato parzialmente eliminato per evaporazione a pressione ridotta, e la sospensione così ottenuta è stata successivamente acidificata con HCl 1M (9mL). Il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione ottenendo in tal modo l'acido **(E)-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico**. Il prodotto così ottenuto è stato utilizzato senza ulteriore purificazione (0.2g, resa 70%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.96 (s all, 1H, NH); 8.72 (s, 1H, 2-H'); 8.68 (s, 1H, NH); 8.66 (s, 1H, NH); 8.02 (d, J=7.9, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.74 (d, J=7.9, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.62-7.53 (m, 3H, 2-H, 3'-H e 5'-H); 7.51-7.42 (m, 4H, 2^{IV}-H, 6^{IV}-H, 2'-H e 6'-H); 7.28 (t, J=8.1, 2H, 3^{IV}-H e 5^{IV}-H); 7.19 (s, 1H, 5''-H); 6.96 (tt, J=7.5, J=1.1, 1H, 4^{IV}-H); 6.57 (d, J=16.1, 1H, 3-H).

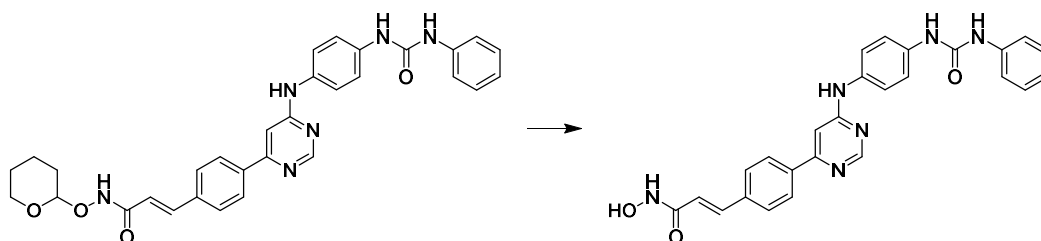
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^v-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di acido (E)-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico (0.2g, 0.3mmol) in DMF (3mL) sono stati aggiunti in sequenza TEA (0.1mL, 0.7mmol), EDC (0.1g, 0.7mmol) ed HOBT (70.0mg, 0.5mmol). La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione sotto atmosfera d'azoto a 30°C per 1 ora e mezza fino alla completa attivazione dell'acido (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Alla miscela di reazione è stato successivamente aggiunto NH₂OTHP (60.0mg, 0.5mmol), la soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina). La miscela di reazione è stata dunque precipitata in soluzione satura di NaCl (20mL) il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato tramite cromatografia su gel di silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5), ottenendo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^v-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide** (0.1g, resa 70%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.31 (s all, 1H, NHO) 9.61 (s, 1H, NH); 8.67 (d, J=0.8, 1H, 2''-H); 8.63 (s all, 2H, NH); 8.06 (d, J=8.5, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.73 (d, J=8.5, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.63-7.51 (m, 3H, 2-H, 3'-H e 5'-H); 7.48-7.41 (m, 4H, 2^{IV}-H, 6^{IV}-H, 2'-H e 6'-H); 7.28 (t, J=7.7, 2H, 3^{IV}-H e 5^{IV}-H); 7.20 (d, J=0.8, 1H, 5''-H); 6.96 (tt, J=7.2, J=1.3, 1H, 4^{IV}-H); 6.60 (d, J=16.1, 1H, 3-H); 4.93 (s all, 1H, OCHO); 4.10-3.91 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.76-1.48 (m, 6H, THP CH₂).

Sintesi di (E)-N-idrossi-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enamide



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^v-il)idrossilammino)-3'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (0.1g, 0.2mmol) in CH₂Cl₂/CH₃OH (rapporto 4/3, 14mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl 1M (1mL). La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione per 16 ore a temperatura ambiente. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina), il precipitato arancione così ottenuto è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato tramite HPLC preparativa RP-C18, ottenendo in tal modo (E)-N-idrossi-4'-{6''-[4'''-(fenilureidio)fenil]pirimid-4''-ilammino}prop-2-enamide (0.1g, resa quantitativa).

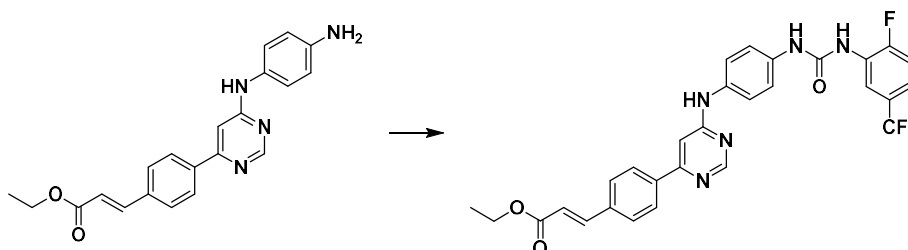
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.85 (s all, 1H, NHO); 9.96 (s all, 1H, NH); 8.72 (s, 1H, 2-H''); 8.68 (s, 1H, NH); 8.66 (s, 1H, NH); 8.02 (d, J=7.9, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.74 (d, J=7.9, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.62-7.53 (m, 3H, 2-H, 3'-H e 5'-H); 7.51-7.42 (m, 4H, 2^{iv}-H, 6^{iv}-H, 2'-H e 6'-H); 7.28 (t, J=8.1, 2H, 3^{iv}-H e 5^{iv}-H); 7.19 (s, 1H, 5''-H); 6.96 (tt, J=7.5, J=1.1, 1H, 4^{iv}-H); 6.57 (d, J=16.1, 1H, 3-H).

HRMS ESI-TOF (M+H⁺): *Calcolato: 467.1826 uma*

Trovato: 467.1888 uma

5.3.4.1.3 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-FLUORO-5^{IV}(TRIFLUOROMETIL)-FENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE

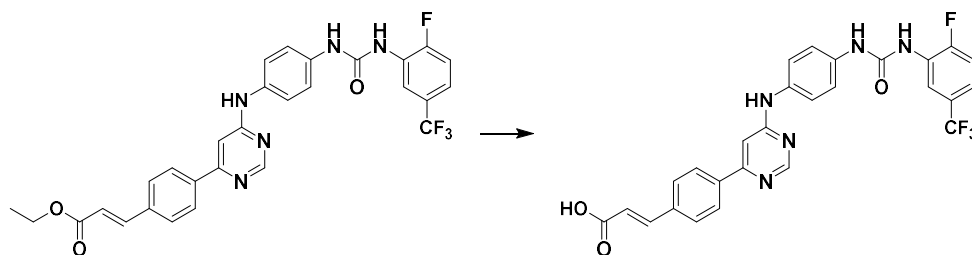
Sintesi di etile (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato



Ad una soluzione di l'etile (E)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (0.2g, 0.5mmol) in DMF (1mL), posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 2-Fluoro-5-(trifluorometil)isocianato (50.0μL, 0.4mmol) in DMF (1mL). La sospensione gialla così ottenuta è stata è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente posta in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). La miscela di reazione è stata dunque diluita in una soluzione satura di NaCl (50mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione. Il solido così ottenuto è stato risospeso in acetonitrile (10mL) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è **etile (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato** (0.2g, resa 82%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.65 (s, 1H, NH); 9.14 (s, 1H, NH); 8.87 (d, J=2.8, 1H, NH); 8.68 (s all, 1H, 2''-H); 8.64 (dd, J=7.5, J=1.9, 1H, 4^{IV}-H); 8.06 (d, J=8.3, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.88 (d, J=8.3, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.71 (d, J=15.9, 1H, 2-H); 7.64 (d, J=8.9, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.54-7.42 (m, 3H, 2'''-H e 6'''-H, 3^{IV}-H); 7.42-7.34 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.22 (s all, 1H, 5''-H); 6.73 (d, J=15.9, 1H, 3-H); 4.21 (d, J=7.4, 2H, CH₂); 1.27 (t, J=7.4, 3H, CH₃).

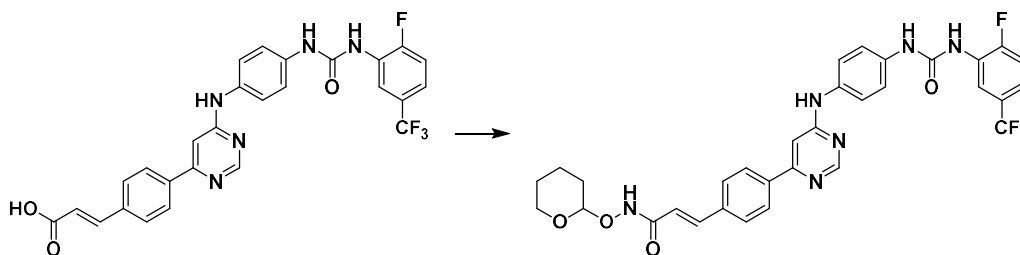
Sintesi di acido (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico



Ad una sospensione di etile (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato (0.2g, 0.4mmol) in THF (4mL) è stata aggiunta una soluzione di NaOH 0.2M (4mL). La miscela così ottenuta è stata lasciata in agitazione a 50°C per 6 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Il solvente organico è stato parzialmente eliminato per evaporazione a pressione ridotta e la sospensione così ottenuta è stata successivamente acidificata con HCl 1M (8mL). Il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione, risospeso in ACN (8mL), e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è l'**acido (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico** (0.2g, resa 87%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.66 (s, 1H, NH); 9.14 (s, 1H, NH); 8.87 (d, J=2.8, 1H, NH); 8.69 (s all, 1H, 2''-H); 8.64 (dd, J=7.5, J=1.9, 1H, 4^{IV}-H); 8.06 (d, J=8.3, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.84 (d, J=8.3, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.68-7.61 (m, 3H, 2-H, 3'''-H e 5'''-H); 7.54-7.42 (m, 3H, 2'''-H e 6'''-H, 3-H^{IV}); 7.42-7.34 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.22 (s all, 1H, 5''-H); 6.62 (d, J=16.0, 1H, 3-H).

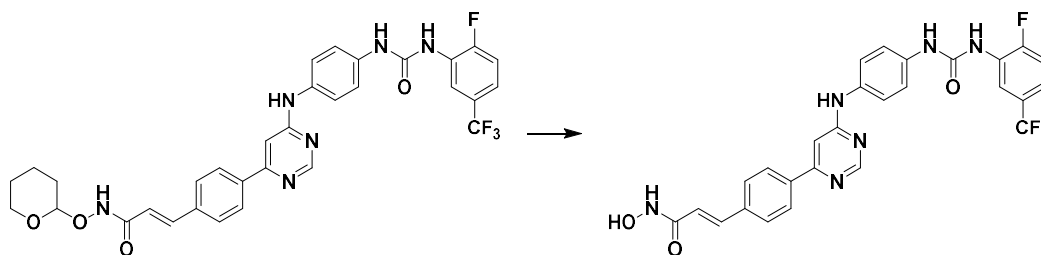
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di acido (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico (0.2g, 0.3mmol) in DMSO (3mL) sono stati aggiunti in sequenza TEA (70.0μL, 0.5mmol), EDC (0.1g, 0.6mmol) e HOBT (60.0mg, 0.4mmol). La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per 1 ora e mezza, fino alla completa attivazione dell'acido (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Successivamente è stato aggiunto NH₂OTHP (50.0mg, 0.4mmol) e la soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina). La miscela di reazione così ottenuta è stata precipitata in soluzione satura di NaCl (70mL) ed il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato tramite cromatografia in gel di silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5), ottenendo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide** (0.2g, resa 81%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.32 (s all, 1H, NHO); 9.66 (s, 1H, NH); 9.15 (s, 1H, NH); 8.87 (d, J=2.8, 1H, NH); 8.69 (s all, 1H, 2''-H); 8.64 (dd, J=7.2, J=1.9, 1H, 4^{IV}-H); 8.06 (d, J=8.3, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.73 (d, J=8.3, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.63 (d, J=8.9, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.59-7.42 (m, 4H, 2'''-H e 6'''-H, 3^{IV}-H, 2-H); 7.42-7.34 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.21 (s all, 1H, 5''-H); 6.60 (d, J=16.0, 1H, 3-H); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.01-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂).

Sintesi di (E)-N-idrossi-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enammide



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enammide (0.2g, 0.3mmol) in CH₂Cl₂/CH₃OH in rapporto 1/1 (22mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl 1M (2mL). La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione per 16 ore a temperatura ambiente. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina), si è ottenuto un precipitato arancione raccolto per filtrazione e purificato tramite HPLC preparativo RP-C18 ottenendo in tal modo **(E)-N-idrossi-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluoro-5^{IV}(trifluorometil)-fenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enammide** (0.2g, resa quantitativa).

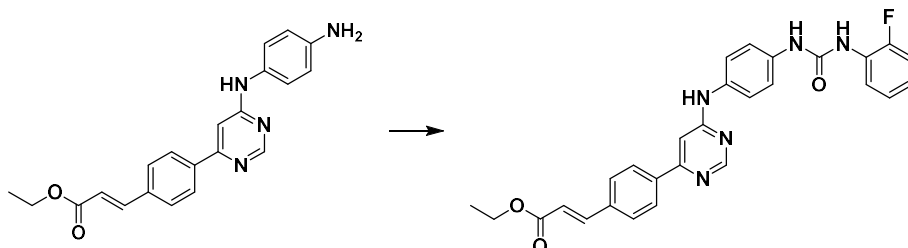
¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.85 (s all, 1H, NHO); 9.20 (s, 1H, NH); 8.90 (d, J=2.8, 1H, NH); 8.73 (s all, 1H, 2''-H); 8.64 (dd, J=7.2, J=1.9, 1H, 4^{IV}-H); 8.04 (d, J=8.3, 2H, 3'-H e 5'-H); 8.04 (d, J=8.3, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.78-7.60 (m, 3H, 3'''-H, 5'''-H, NH); 7.57-7.45 (m, 4H, 2'''-H, 6'''-H, 3^{IV}-H, 2-H); 7.43-7.35 (m, 1H, 6^{IV}-H); 7.22 (s all, 1H, 5''-H); 6.57 (d, J=15.5, 1H, 3-H).

HRMS ESI-TOF (M+H⁺): Calcolato: 553.1606 uma

Trovato: 553.1616 uma

5.3.4.1.4 TENTATIVO DI SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-FLUORO FENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE

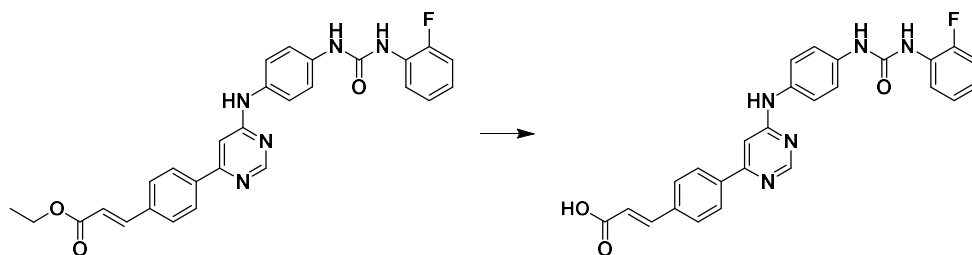
Sintesi di etile (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato



Ad una soluzione di l'etile (E)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (0.2g, 0.4mmol) in DMF (1mL), posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di 2-Fluoroisocianato (50.0μL, 0.5mmol) in DMF (1mL). La sospensione gialla così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente posta in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). La miscela di reazione è stata dunque diluita in una soluzione satura di NaCl (50mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione. Il solido così ottenuto è stato risospeso in acetonitrile (9mL) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è **etile (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato** (0.2g, resa 72%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 9.64 (s, 1H, NH); 9.05 (s all, 1H, NH); 8.67 (d, J=0.8, 1H, 2''-H); 8.52 (d, J=2.6, 1H, NH); 8.17 (td, J=8.1, J=1.7, 1H, H^{IV}); 8.06 (d, J=8.4, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.87 (d, J=8.4, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.71 (d, J=15.9, 1H, 2-H); 7.61 (d, J=9.0, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.44 (d, J=9.0, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.28-7.20 (m, 2H, H^{IV}, 5''-H); 7.14 (td, J=7.5, J=0.8, 1H, H^{IV}); 7.04-6.96 (m, 1H, H^{IV}); 6.73 (d, J=15.9, 1H, 3-H); 4.21 (q, J=6.6, 2H, CH₂); 1.27 (t, J=6.6, 3H, CH₃).

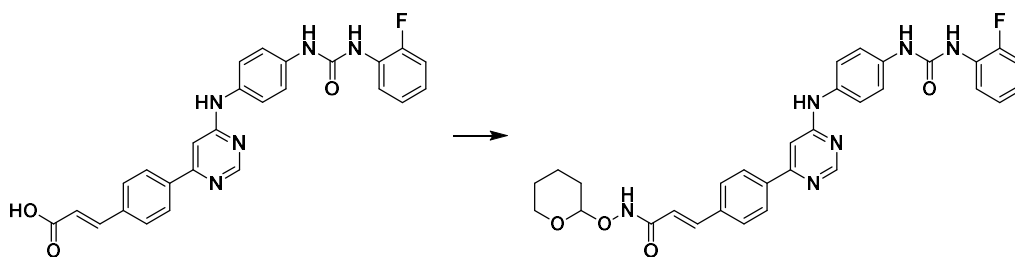
Sintesi di acido (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino} fenilprop-2-enoico



Ad una sospensione di etile (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}prop-2-enoato (0.2g, 0.3mmol) in THF (3mL) è stata aggiunta una soluzione di NaOH 0.2M (3mL). La miscela così ottenuta è stata lasciata in agitazione a 50°C per 16 ore (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Il solvente organico è stato parzialmente eliminato per evaporazione a pressione ridotta e la sospensione così ottenuta è stata successivamente acidificata con HCl 1M (7mL). Il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione, risospeso in ACN (7mL), e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è l'**acido (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino} fenilprop-2-enoico** (0.2g, resa 97%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.06 (s all, 1H, COOH); 9.11 (s, 1H, NH); 8.75 (s all, 1H, 2''-H); 8.55 (d, J=2.6, 1H, NH); 8.17 (td, J=8.1, J=1.7, 1H, H^{IV}); 8.02 (d, J=8.4, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.88 (d, J=8.4, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.69-7.57 (m, 3H, 2-H, 2'''-H e 6'''-H); 7.47 (d, J=9.0, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.28-7.20 (m, 2H, H^{IV}, 5''-H); 7.14 (td, J=7.5, J=0.8, 1H, H^{IV}); 7.04-6.96 (m, 1H, H^{IV}); 6.66 (d, J=15.9, 1H, 3-H).

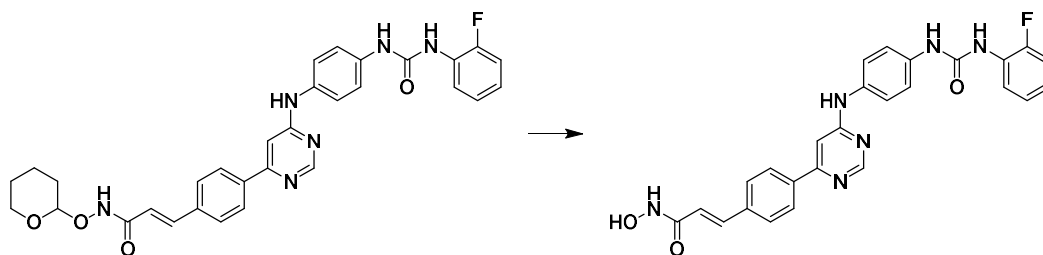
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di acido (E)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enoico (0.14g, 0.30mmol) in DMSO (3mL) sono stati aggiunti in sequenza TEA (60.0μL, 0.5mmol), EDC (0.1g, 0.5mmol) e HOBT (50.0mg, 0.5mmol). La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per 1 ora e mezza, fino alla completa attivazione dell'acido (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Successivamente è stato aggiunto NH₂OTHP (50.0mg, 0.4mmol) e la soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina). La miscela di reazione così ottenuta è stata precipitata in soluzione satura di NaCl (60mL) ed il solido formatosi è stato raccolto per filtrazione e successivamente purificato tramite cromatografia in gel di silice (CH₂Cl₂/CH₃OH, 95/5), ottenendo (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (0.1g, resa 64%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.32 (s all, 1H, NHO); 9.64 (s, 1H, NH); 9.05 (s all, 1H, NH); 8.67 (d, J=0.8, 1H, 2''-H); 8.52 (d, J=2.65, 1H, NH); 8.17 (td, J=8.1, J=1.7, 1H, H^{IV}); 8.06 (d, J=8.4, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.73 (d, J=8.4, 3'-H e 5'-H); 7.61 (d, J=9.0, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.55 (d, J=15.9, 1H, 2-H); 7.44 (d, J=9.0, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.28-7.22 (m, 1H, H^{IV}); 7.21 (s all, 1H, 5''-H); 7.14 (td, J=7.5, J=0.8, 1H, H^{IV}); 7.04-6.95 (m, 1H, H^{IV}); 6.60 (d, J=15.9, 1H, 3-H); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.01-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂).

Tentativo di sintesi di (E)-N-idrossi-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide

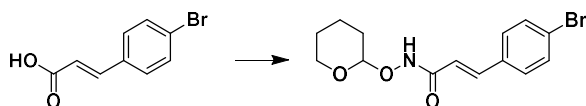


Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-''ilammino}fenilprop-2-enamide (0.1g, 0.2mmol) in CH₂Cl₂/CH₃OH in rapporto 3/2 (34mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl 1M (1mL). La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione per 16 ore. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina) si ottiene un precipitato arancione che è stato recuperato tramite filtrazione. Per il solido ottenuto è stata tentata la purificazione tramite colonna in gel di silice (THF/MeOH 9/1 +1% HCOOH). Dopo l'evaporazione del solvente a pressione ridotta, è stato ottenuto un olio marrone. Dati NMR non concordavano con i dati attesi, dunque il prodotto è stato eliminato.

5.3.4.2 METODO CONVERGENTE

5.3.4.2.1 SINTESI DI (E)-N-IDROSSI-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-FLUOROFENILUREIDIO)FENIL]-PIRIMID-4''-ILAMMINO}FENILPROP-2-ENAMMIDE

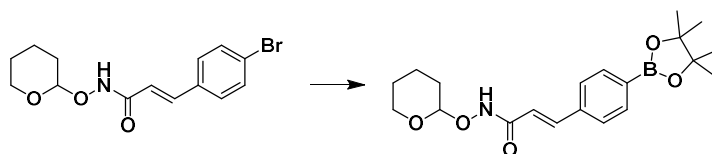
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-bromofenilprop-2-enoato



Ad una soluzione di acido 4-bromocinnamico (0.5g, 2.0mmol) in DMF (4mL) posta in bagno di ghiaccio, sono stati aggiunti in sequenza TEA (0.4mL, 3.0mmol), EDC (0.7g, 3.4mmol) e HOBT (0.3g, 2.4mmol). La miscela così ottenuta è lasciata in agitazione sotto atmosfera d'azoto, a temperatura ambiente per 1 ora e mezza, fino alla completa attivazione dell'acido (TLC: CHCl₃/CH₃OH, 9/1). Successivamente è stato aggiunto NH₂OTHP (0.3g, 2.4mmol) e la soluzione così ottenuta è stata lasciata in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina). La miscela di reazione è stata diluita in una soluzione satura di NaCl (25mL) e successivamente estratta con EtOAc (3 x 15mL). La fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ e il solvente organico eliminato per evaporazione a pressione ridotta. La miscela di composti ottenuta è stata quindi purificata tramite cromatografia in gel di silice con eluente CH₂Cl₂/MeOH in rapporto 9/1, ottenendo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-bromofenilprop-2-enoato** (0.6g, resa 93%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.27 (s all, 1H, NHO); 7.62 (d, J=8.5, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.53 (d, J=8.5, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.47 (d, J=15.9, 1H, 2-H); 6.52 (d, J=15.9, 1H, 3-H); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.10-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂).

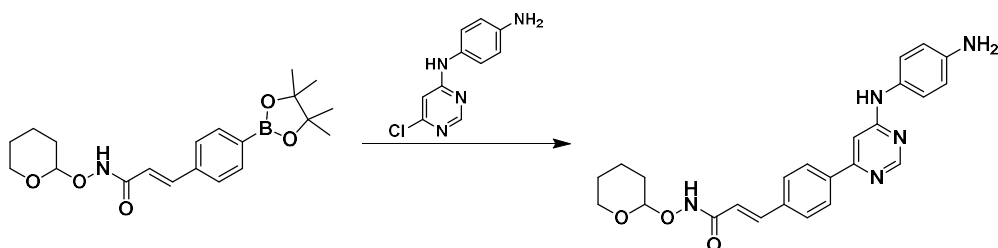
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-boropinacolfenilprop-2-enoato



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-bromofenilprop-2-enoato (0.2g, 0.5mmol) in DMF (1mL) stati aggiunti in sequenza acetato di potassio (0.2g, 1.5mmol), palladio difenilfosfinoferrocenedicloruro (20.0mg, 30.0 μ mol) e bispinacolato di diboron (0.1g, 0.5mmol). La miscela di reazione è stata successivamente posta in bagno ad olio preriscaldato a 70°C per 2.5 ore. A reazione completa (TLC: CE/EtOAc, 2/8, stain in vanillina) la miscela di reazione è stata diluita in una soluzione satura di NaCl (10mL) ed estratta con EtOAc (15 x 3mL). Successivamente la fase organica è stata anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente eliminato per evaporazione a pressione ridotta. La miscela di composti così ottenuta è stata purificata mediante cromatografia su gel di silice con eluente CE/EtOAc in rapporto 3/7), ottenendo in tal modo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-boropinacolfenilprop-2-enoato** (0.2g, resa 78%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.27 (s all, 1H, NHO); 7.70 (d, J=7.9, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.57 (d, J=7.9, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.48 (d, J=15.9, 1H, 2-H); 6.57 (d, J=15.9, 1H, 3-H); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.01-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂); 1.30 (s, 12H, pinacolato).

Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^{IV}-il)idrossilammino)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato



Metodo A

Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-boropinacol fenilprop-2-enoato (0.2g, 0.4mmol) in dimetossietano (1mL) sono stati aggiunti in sequenza la 4-(6'-cloropirimidin-4'-ilammino)anilina (70.0mg, 0.3mmol), una soluzione al 10% di NaHCO₃ (1mL) e tetrakis(trifenilfosfina)palladio⁰ (10.0mg, 13.0μmol). La sospensione così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente irradiata a microonde a 150 W, raggiungendo la temperatura di 130° C mantenuta per 5 minuti, sfruttando la regolazione automatica della potenza e del raffreddamento dello strumento (TLC: CE/EtOAc, 2/8, stain in vanillina). La miscela di reazione è stata dunque precipitata in una soluzione satura di NaCl (20mL). Il precipitato così ottenuto è stato raccolto per filtrazione e purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (CE/EtOAc, 3/7), ottenendo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^{IV}-il)idrossilammino)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato** (40.0mg, resa 26%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 11.27 (s all, 1H, NHO); 9.23 (s all, 1H, NH); 8.57 (d, J=0.8, 1H, 2''-H); 8.01 (d, J=8.3, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.70 (d, J=7.9, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.54 (d, J=15.9, 1H, 2-H); 7.22 (d, J=7.9, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.03 (s all, 1H, 5''-H); 6.62-6.55 (m, 3H, 3-H, 3'''-H e 5'''-H); 4.96 (s all, 2H, NH₂); 4.91 (s all, 1H, OCHO); 4.01-3.89 (m, 1H, THP CH₂); 3.59-3.48 (m, 1H, THP CH₂); 1.75-1.47 (m, 6H, THP CH₂).

Metodo B

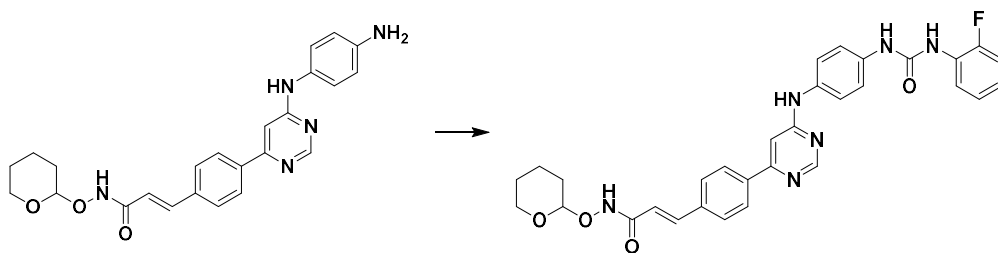
Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-boropinacol fenilprop-2-enoato (0.2g, 0.5mmol) in diossano (7mL) sono stati aggiunti in sequenza la 4-(6'-cloropirimidin-4'-ilammino)anilina (0.1g, 0.5mmol), Cs₂CO₃ (0.4g, 1.2mmol) e palladio difenilfosfinoferrocenedicloruro (20.0mg, 30.0μmol). La miscela è stata posta in

bagno ad olio a 70°C. La reazione è stata monitorata ogni ora tramite TLC (CH₂Cl₂/MeOH, 9/1, stain in vanillina). Dopo 1 ora, compaiono nuove macchie che però non corrispondono al prodotto d'arrivo. La situazione resta invariata dopo 72h. La temperatura del bagno ad olio è stata quindi aumentata a 95°, ma il prodotto di interesse non si è formato nemmeno dopo 24 ore. La temperatura è stata quindi abbassata a 60°C e la reazione tenuta in agitazione per 96 ore. Non vengono rilevate nuove macchie in TLC e comunque non vengono rilevate macchie con stesso R_f del prodotto di arrivo. La miscela è dunque eliminata.

Metodo C

Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2''-il)idrossilammino)-4'-boropinacol fenilprop-2-enoato (0.2g, 0.4mmol) in dimetossietano (1mL) sono stati aggiunti in sequenza la 4-(6'-cloropirimidin-4'-ilammino)anilina (70.0mg, 0.3mmol), una soluzione al 10% di NaHCO₃ (1mL) e tetrakis(trifenilfosfina)palladio⁰ (10.0mg, 10.0µmol). La reazione è posta a riflusso per 1 ora. A reazione completa (TLC: CE/EtOAc, 2/8, stain in vanillina) la miscela di reazione è stata diluita in una soluzione satura di NaCl (30mL) e successivamente estratta con EtOAc (3 x 20mL). La fase organica è stata quindi anidrificata con Na₂SO₄ ed il solvente eliminato per evaporazione a pressione ridotta. Il solido ottenuto è stato purificato mediante colonna cromatografica su gel di silice (CE/EtOAc, 1/9), ottenendo **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^{IV}-il)idrossilammino)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato** (60.0mg, resa 33%), con spettro ¹H-NMR identico a quello precedentemente riportato

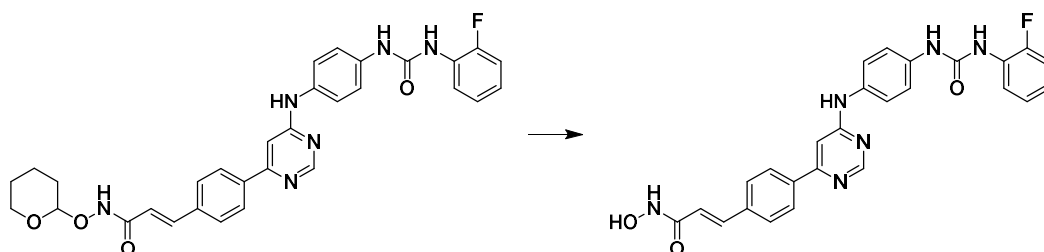
Sintesi di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenil ureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^{IV}-il)idrossilammino)-4'-[6''-(4'''-amminofenil)-pirimid-4''-ilammino]fenilprop-2-enoato (80.0mg, 0.2mmol) in DMF (2mL), posta in bagno di ghiaccio, è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione 2-fluorofenilisocianato (20.0 μ L, 0.2mmol) in DMF (1mL). La soluzione gialla così ottenuta è stata degassata mediante flusso d'azoto mantenuto per 1 minuto e successivamente posta in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore (TLC: EtOAc/EtOH, 95/5, stain in vanillina). La miscela di reazione è stata dunque diluita in una soluzione satura di NaCl (50mL) ed il precipitato formatosi è stato raccolto per filtrazione. Il solido così ottenuto è stato risospeso in acetonitrile (5mL) e lasciato in agitazione a temperatura ambiente per 16 ore. Il solido raccolto tramite filtrazione è **(E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide** (90.0mg, resa 86%).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): identico a quello precedentemente riportato

Sintesi di (E)-N-idrossi-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide



Ad una soluzione di (E)-N-(O-(tetraidro-piran-2^V-il)idrossilammino)-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide (90.0mg, 0.2mmol) in CH₂Cl₂/CH₃OH in rapporto 1/1 (22mL) è stata aggiunta goccia a goccia una soluzione di HCl 1M (1mL). La soluzione così ottenuta è stata posta in agitazione per 16 ore a temperatura ambiente. A reazione completa (TLC: CH₂Cl₂/CH₃OH, 9/1, stain in vanillina), si è ottenuto un precipitato arancione raccolto per filtrazione e purificato tramite HPLC preparativo RP-C18 ottenendo in tal modo **(E)-N-idrossi-4'-{6''-[4'''-(2^{IV}-fluorofenilureidio)fenil]-pirimid-4''-ilammino}fenilprop-2-enamide** (80.0mg, resa quantitativa).

¹H-NMR (DMSO-*d*₆): 10.01 (s all, 1H, NHO); 9.09 (s, 1H, NH); 8.74 (s all, 1H, 2''-H); 8.54 (d, J=2.6, 1H, NH); 8.16 (td, J=8.3, J=1.5, 1H, H^{IV}); 8.02 (d, J=8.6, 2H, 2'-H e 6'-H); 7.74 (d, J=8.6, 2H, 3'-H e 5'-H); 7.61 (d, J=9.0, 2H, 2'''-H e 6'''-H); 7.52 (d, J=16.2, 1H, 2-H); 7.47 (d, J=9.0, 2H, 3'''-H e 5'''-H); 7.28-7.22 (m, 1H, H^{IV}); 7.20 (s all, 1H, 5''-H); 7.14 (td, J=7.9, J=0.8, 1H, H^{IV}); 7.04-6.96 (m, 1H, H^{IV}); 6.57 (d, J=16.2, 1H, 3-H).

HRMS ESI-TOF (M+H⁺): *Calcolato:* 485.1732 *uma*

Trovato: 485.1870 *uma*

6. BIBLIOGRAFIA

1. Medina-Franco, J. L., Giulianotti, M. A., Welmaker, G. S., & Houghten, R. A. (2013). Shifting from the single to the multitarget paradigm in drug discovery. *Drug Discov Today*, 495-501.
2. (2019, Settembre 6). Tratto da American Cancer Society: <https://www.cancer.org/treatment/treatments-and-side-effects/treatment-types/targeted-therapy.html>
3. Bayat Mokhtari, R., Homayouni, T. S., Baluch, N., Morgatskaya, E., Kumar, S., Das, B., & Yeager, H. (2017). Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget*, 38022-38043.
4. Nguyen, T., Dai, Y., Attkisson, E., Kramer, L., Jordan, N., Nguyen, N., . . . Grant, S. (2011). HDAC inhibitors potentiate the activity of the BCR/ABL kinase inhibitor KW-2449 in imatinib-sensitive or -resistant BCR/ABL+leukemia cells in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*, 3219-32.
5. Okabe, S., Tauchi, T., Kimura, S., Maekawa, T., Kitahara, T., Tanaka, Y., & Ohyashiki, K. (2014). Combining the ABL1 kinase inhibitor ponatinib and the histone deacetylase inhibitor vorinostat: a potential treatment for BCR-ABL-positive leukemia. *PLoS One*. doi:<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089080>
6. Jing Wang, N. W. (2013). Potential Advantages of CUDC-101, a Multitargeted HDAC, EGFR, and HER2 Inhibitor, in Treating Drug Resistance and Preventing Cancer Cell Migration and Invasion. *Mol Cancer Ther*, 12, 925-936. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-1045
7. (2019, Settembre 08). Tratto da farmacovigilanza.eu: <https://www.farmacovigilanza.eu/node/40>
8. Tannishtha Reya, S. J. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*(414), 105-111.
9. Gandin, V., Ferrarese, A., Dalla Via, M., Marzano, C., Chilin, A., & Marzaro, G. (2015). Targeting kinases with anilinopyrimidines: discovery of N-phenyl-N'-[4-(pyrimidin-4-ylamino)phenyl]urea derivatives as selective inhibitors of class III receptor tyrosine kinase subfamily. *Sci Rep*, 16750.

10. Roskoski, R. (2015). A historical overview of protein kinases and their targeted small molecule inhibitors. *Pharmacol Res*, 1-23.
11. Mologni, L., Dalla Via, M., Chilin, A., Palumbo, M., & Marzaro, G. (2017). Discovery of (wt) RET and (V804M) RET Inhibitors: From Hit to Lead. *ChemMedChem*, 1390-1398.
12. Ullrich, A. a. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell*, 203-212.
13. Schwab, M. (2011). *Encyclopedia of cancer (3 ed.)*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
14. Verstraete, K. &. (2012). Extracellular assembly and activation principles of oncogenic class III receptor tyrosine kinases. *Nat Rev Cancer*, 12, 753–766.
15. Lillian R. Klug, J. D. (2018). Structural and clinical consequences of activation loop mutations in class. *Pharmacology & Therapeutics*, 191, 123–134.
16. Yukihiko Kitamura, S. H. (2001). A loss-of-function mutation of c-kit results in depletion of mast cells and interstitial cells of Cajal, while its gain-of-function mutation results in their oncogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 477, 165-171.
17. Reilly, J. T. (2002). Class III receptor tyrosine kinases: role in leukaemogenesis. *British Journal of Haematology*, 116, 744-757.
18. Lasota J, D.-M. A. (2013). Gastrointestinal stromal. *Mod Pathol*, 1257–1264.
19. C.H. Heldin, B. W. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol. Rev.*, 1283-1316.
20. Ekman S, R. T.-H. (1999). Increased mitogenicity of an ab heterodimeric PDGF receptor complex correlates with lack of RasGAP binding. *Oncogene*, 2481–2488.
21. Heinrich MC, C. C. (2003). PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science*, 708-710.
22. Golub TR, B. G. (1994). Fusion of PDGF receptor b to a novel ets-like gene, tel, in chronic myelomonocytic leukemia with t(5;12) chromosomal translocation. *Cell*, 307–316.
23. Lemmon, J. S. (2013). Structural and Functional Properties of Platelet-Derived Growth Factor and Stem Cell Factor Receptors. *Cold Spring Harb Perspect Biol*.
24. Clarke ID, D. P. (2003). A human brain tumor-derived PDGFR-a deletion mutant is transforming. *Oncogene*, 722-733.

25. Pietras K, P. J. (2008). Functions of paracrine PDGF signaling in the proangiogenic tumor stroma revealed by pharmacological targeting. *PLoS Med*.
26. Heldin C-H, W. B. (1999). Mechanism of action and in vivo role of platelet-derived growth factor. *Physiol Rev*, 1283–1316.
27. Phillip P. Knowles, J. M.-R. (2006). Structure and Chemical Inhibition of the RET Tyrosine Kinase Domain. *The Journal of Biological Chemistry*, 33577-33587. doi:10.1074/jbc.M605604200
28. Arighi E., B. M. (2005). RET tyrosine kinase signaling in development and cancer. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 16, 441-467. doi:https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2005.05.010
29. Wang, X. (2013). Structural studies of GDNF family ligands with their receptors- Insights into ligand recognition and activation of receptor tyrosine kinase RET. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics*, 2205-2212.
30. Charis Eng, M. P., Clayton, D., Isabelle Schuffenecker, P., & al, e. (1996). The Relationship Between Specific RET Proto-oncogene Mutations and Disease Phenotype in Multiple Endocrine Neoplasia Type 2. *JAMA*, 276, 1575-1579. doi:10.1001/jama.1996.03540190047028
31. *RCP Cabometyx*. (2019, Settembre 08). Tratto da [ema.europa.eu](https://www.ema.europa.eu): https://www.ema.europa.eu/en/documents/product-information/cabometyx-epar-product-information_it.pdf
32. Subbiah V, G. J. (2018). Precision Targeted Therapy With BLU-667 for RET-Driven Cancers. *Cancer Discov*, 836-849. doi: 10.1158/2159-8290
33. Jenuwein, T., & Allis, C. D. (2001). Translating the histone code. *Science*, 1074-80.
34. Miller, T. A., Witter, D. J., & Belvedere, S. (2003). Histone deacetylase inhibitors. *Journal of medicinal chemistry*, 5097-5116.
35. Zhou, J., Wu, R., & Luo, H. B. (2015). Inhibition mechanism of SAHA in HDAC: a revisit. *Phys Chem Chem Phys*, 29483-8.